

2 Ley.

S.S.A.

A.M.A.L.A.C.

CENTRO DERMATOLOGICO

" DR. LADISLAO DE LA PASCUA "

DIRECTORA: DRA. OBDULIA RODRIGUEZ.

PROFESOR DEL CURSO: DR. FERNANDO LATAPI.

ASESOR: DR. VIRGILIO SANTAMARIA.

F.D.A./E.B. METODO PARA MEDIR
LA VIABILIDAD DEL MYCOBACTERIUM
LEPRAE.

TESIS DE POSTGRADO EN DERMATOLEPROLOGIA
Y MICOLOGIA.

DR. JORGE ALBERTO CERVERA CAMPS.

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIM

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

CAPITULO	Pag.
I.- INTRODUCCION.	
II.- MYCOBACTERIUM LEPRAE.	
2.1 Historia.	1
2.2 Generalidades y clasificación.	5
2.3 Morfología.	9
2.4 Indice bacteriológico y morfológico.	14
2.5 Microscopía electrónica.	20
2.6 Composición química.	24
2.7 Bioquímica.	26
III.-LEPRA EXPERIMENTAL.	
3.1 Intentos de inoculación a humanos.	30
3.2 Intentos de cultivo.	32
3.3 Transmisión experimental de lepra a los animales.	36
3.4 El armadillo.	41
IV.- METODOS DE TINCION	
4.1 Generalidades	49

CAPITULO	Pag.
4.2 Ziehl-Neelsen y Fite-Faraco.	49
4.3 Verde Malaquita-Fucsina.	53
4.4 Carbol-Fucsina-Nigrosina.	56
4.5 Técnica de Harada.	56
4.6 Sudan III.	57
V.- FDA/ES METODO PARA MEDIR LA VIABILIDAD DEL MYCOBACTERIUM LEPRAE.	
5.1 Diacetato de fluoresceína/Bromuro de etidio	59
5.2 Objetivos.	63
5.3 Material y Metodo.	65
5.4 Preparación de la suspensión de bac- terias.	66
5.5 Técnicas de Tinción y Lectura.	69
VI.- RESUMENES DE HISTORIAS CLINICAS.	74
VII.- RESULTADOS.	130
VIII.-DISCUSION.	135

CAPITULO	Pag.
IX.- CONCLUSIONES.	139
X.- BIBLIOGRAFIA.	142

INDICE DE FIGURAS.

Figura		Pag.
1	GERARD HENRICH ARMAUER HANSEN.	2
2	FOTOMICROSCOPIA ELECTRONICA DEL M. LEPRAE.	21
3	ESQUEMA DE LAS FORMAS AISLADAS DEL M. LE- PRAE AL MICROSCOPIO ELECTRONICO.	22
4	EL ARMADILLO.	45
5	WALDENAR KIRCHHEIMER.	46
6	ELEANOR STORRS.	47
7	CONVERSION DEL DIACETATO DE FLUORESCEINA EN FLUORESCEINA.	60
8	INCORPORACION DEL BROMURO DE ETIDIO AL DNA.	62
9	PREPARACION DE LA SUSPENSION DE BACTERIAS.	67

Figura

Pag.

**10 FOTOMICROGRAFIA DEL PDA/ES DEL MYCOBAC-
TERIUM SMITHII Y DEL MYCOBACTERIUM
LEPRAE.**

72

INDICE DE CUADROS.

Cuadro		Pag.
1	CLASIFICACION DE LAS MICOBACTERIAS	7
2	MICOBACTERIAS QUE PRODUCEN LESIONES CUTANEAS.	8
3	DIFERENCIAS ENTRE EL M. LEPRAE Y EL M. TUBERCULOSIS.	11
4	PORCENTAJE DE SUBSTANCIAS CONTENIDAS POR EL M. LEPRAE Y EL M. TUBERCULOSIS.	13
5	COMPOSICION QUIMICA DEL M. LEPRAE.	25
6	PROCEDIMIENTO DE BAUGARTEN.	51
7	COLORACION DE ZIEHL-NEESEN.	52
8	METODO DE LA DECOLORACION DE LA VARIACION DE LA TECNICA DE FITE-FARACO.	54
9	SOLUCION DE HANKS.	68

Quadro		Pag.
10	METODO PARA PREPARAR LA SOLUCION DE FDA/EB PARA ALMACENAR.	70
11	METODO PARA ELABORAR LAS SOLUCIONES DE TRABAJO DE FDA/EB.	71
12	RESULTADOS EN PACIENTES LEPTOMATOSOS.	132
13	RESULTADOS EN PACIENTES CON LEFRA CA- SOS INDETERMINADOS Y CON LEFRA TUBER- CULOIDE.	133

I INTRODUCTION

INTRODUCCION

La lepra es una enfermedad que a través de los tiempos el progreso en su diagnóstico y tratamiento, ha sido demasiado lento.

Ha ocupado la atención de grandes hombres que han tenido la preocupación de resolver las incógnitas que encierra esta enfermedad, venciendo los atavíos y repudio que a través de los siglos, este padecimiento ha llevado en su esencia.

Sin embargo a pesar de todo lo citado anteriormente, son pocos los médicos que tienen un verdadero conocimiento acerca de esta enfermedad, tal vez puntos que influyen en la falta de motivación para el estudio de la lepra, es que es una enfermedad de pobres y las posibilidades de fracaso en técnicas nuevas aplicadas a esta patología son altas.

Uno de los procedimientos que podría ayudar a resolver muchos puntos de importancia, que hasta hoy no han sido resueltos, acerca de esta enfermedad, es el método de F.D.A./E.B. (Diacetato de fluoresceína/Bromuro de etidio), que solo después de los estudios de Ferdisky, Patona y Jarguin, sobre fisiología celular

y después de la elaboración y síntesis de los doctores Kvach, Veras y la Dra. Guadalupe Munguía ha sido posible efectuar.

La idea de llevar a cabo el presente trabajo, surgió, después de la presentación del trabajo para ingreso a la Sociedad Mexicana de Dermatología, de la Dra. Munguía el cual fue: Método F.D.A./E.B. para medir la viabilidad del *Mycobacterium leprae* y posteriormente bajo el apoyo científico y moral del Dr. Virgilio Santamaría, nos propusimos la tarea de llevar a su efecto, el mismo trabajo, solo que en el Centro Dermatológico Pascua, ya que el presentado por la Dra. Munguía fue hecho en la Universidad John Hopkins, de los Estados Unidos.

Tal vez las opiniones que suscitó entre los compañeros el efectuar éste fueron escepticas, pero hay que tener la suficiente entereza para tratar de hacer lo que otros no han hecho.

Lo efectuado pretende ser solo una revisión breve acerca de la historia, taxonomía, intentos de cultivo e inoculación del *Mycobacterium leprae*, valorar la dificultad para aplicación del método F.D.A./E.B. en México y si es posible, evaluar los distintos esquemas de tratamiento que se llevan en el Centro Pascua, en la lepra

lepromatosa.

Creemos que si este método es efectivo, será de gran ayuda para el investigador básico, en la evaluación de diversos métodos de cultivo, ya que sirve para observar si el bacilo se encuentra vivo o muerto, sin esperar a practicar el método de inoculación a la almohadilla plantar del ratón.

II MYOBACTERIUM LEPRAE

HISTORIA.

En la India, en el Rig Veda Samhita de Atreya (1 400 años A.C.) y en los escritos de Charaka y Susruta (Siglo VII A.C.) se describe ampliamente la Kusta o lepra y se mencionan los primeros conceptos de los que se tienen conocimiento sobre la etiología de la lepra, se indica que la lepra es hereditaria, pues consideraban leprosos a todo hijo de padres con lepra. Esto fue sostenido hasta 1868 y sabios tan prominentes como Danielsen y Boeck apoyaban la teoría que la etiología de la lepra era hereditaria y que tenía influencia la deficiencia alimentaria. (11-67).

Por fin en ese mismo año, el bacilo fue descubierto por Gerard Henrich Armauer Hansen, cuando al examinar las "Lepra Zellen" (células leprosas) de Virchow, observó en ellas lo que él llamó "braune koerperchen" (corpúsculos amarillos) y en esas masas amarillentas, vistas primero por Danielsen, pero que no les dió verdadera significancia, hasta que Hansen afirmó que eran bacterias (67). Virchow había considerado las manchas amarillentas como células de degeneración grasa (2).

El hallazgo del bacilo productor de la lepra fue



GERARD HENRICH ARMAUER HANSEN

(Fig. 1)

realizado después de muchos años de investigación en los enfermos de lepra, este hecho fue trascendental en la bacteriología y fue diez años antes del descubrimiento del bacilo de la tuberculosis (11).

El mismo Hansen en 1874 comunicó este descubrimiento en el informe anual del Hospital de San Jorge en la ciudad de Bergen, Noruega. Su suegro Danielsen a pesar del descubrimiento, se seguía oponiendo a que la etiología de la lepra fuera bacilar, ya que él y otros se habían inoculado tejidos de enfermos de lepra y no habían enfermado. En esa época se pensaba que las bacterias solo producían enfermedades agudas (2).

Koch describió según él, diez años antes que Hansen la positividad del *Mycobacterium leprae* para la tinción de Gram y la disposición en globias de éste, pretendió ser el descubridor y que el bacilo llevara su nombre (2).

Neisser estudió el bacilo, descubriendo su positividad para la tinción de Gram, también describió su agrupación en globias (2-15).

En 1897 Virchow describió las células que hoy llevan

su nombre y la localización intracelular del bacilo. Posteriormente Hansen ilustre descubridor del bacilo que hoy lleva su nombre, trató de inocular el bacilo en el ojo de una mujer y ésto le causó el cese de sus actividades como médico (2).

Hansen había denominado al agente causal de la lepra, *Bacillus leprae*, posteriormente éste recibió varios nombres tales como *Cocothrix leprae*, *Streptothrix leprae*, etc., hasta que la Sociedad Americana de Bacteriologistas por recomendación de la Leonard Wood Memorial Conference (Manila 1931), decidió llamarle *Mycobacterium leprae*, nombre que ha persistido hasta nuestros días (2).

GENERALIDADES Y CLASIFICACION

El bacilo de Hansen se encuentra comprendido dentro del género *Mycobacterium*, el cual también comprende varios microorganismos que difieren de la gran mayoría de las bacterias por contener en abundancia sustancias c_ereas o grasas. Este material se tiñe con dificultad pero una vez teñido ofrece resistencia a la decoloración con ácidos, lo que hace que se dificulte su clasificación como Gram negativos o Gram positivos, por lo que se clasifican como ácido resistentes (17). Además de las muchas formas saprófitas, el grupo *Mycobacterium* comprende organismos patógenos que causan enfermedades crónicas con lesión del tipo de granuloma infeccioso, produciendo enfermedades que se caracterizan por la presencia de nódulos en la piel y en diversos órganos (17).

Estas bacterias se desarrollan en forma de bacilos delgados, rectos o ligeramente curvos, son inmóviles. Estos bacilos son aerobios estrictos y derivan su energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos del carbono (2-7-17). Son más resistentes a los agentes químicos que otras bacterias debido a la naturaleza hidrofóbica de la superficie celular y a su crecimiento en grumos. En presencia de agentes humectantes como

el Tween 80, los organismos se tornan completamente susceptibles a una variedad de sustancias químicas (17-42).

Para el bacilo de Hansen no se han cumplido los postulados de Koch, ya que no ha podido ser cultivado in vitro.

Diferentes opiniones existen de que si en su transmisión interviene un huésped intermediario como las moscas y las pulgas. Morrow considera que en la mayoría de los casos el organismo penetra en el cuerpo humano a través de la membrana mucosa del tracto respiratorio y del tracto intestinal. Heisser aparentemente parece haber corroborado esta opinión, ya que en estudios realizados en 1 200 casos, encontró que el 75 % de ellos el síntoma más precoz fue la ulceración de la mucosa nasal (17-35-48).

CLASIFICACION

Clase: Actinomycetales.

Orden: Mycobacteriales.

Familia: Mycobacteriáceas.

Género: Mycobacterium.

MYCOBACTERIUM.

- 1.- *M. leprae* (Bacilo de Hansen).
- 2.- *M. tuberculosis* (humano, bovis y aviarium).
- 3.- *M. smegmatis*.
- 4.- *M. murium* (Bacilo de Stefansky).
- 5.- *M. chabotier*.
- 6.- *M. fortuitum*.
- 7.- *M. ulcerans* (Bacilo de Bairnsdal).
- 8.- *M. balnei* o *M. marinum* (Bacilo de las piscinas).
- 9.- *M. phlei*.
- 10.- *M. bubalorum* o *bovium*.
- 11.- *M. kakenifu*.
- 12.- *M. paratuberculosis* (Bacilo de Johne).
- 13.- *M. kasongo*.
- 14.- *M. abscessus*.
- 15.- *Mycobacterias atípicas o anónimas.*
 - a) Grupo Runyon I.
 - b) Grupo Runyon II.
 - c) Grupo Runyon III.
 - d) Grupo Runyon IV.

MYCOBACTERIAS QUE PRODUCEN
LESIONES CUTANEAS.

- 1.- *M. leprae*.
 - 2.- *M. tuberculosis*.
 - 3.- *M. abscessus*.
 - 4.- *M. marinum* (*balnei*).
 - 5.- *M. kansasii* (Grupo Runyon I).
 - 6.- *Mycobacterium escotocromógenos*
(Grupo Runyon II).
 - 7.- *Mycobacterium no fotocromógenos*
(Grupo Runyon III) (organismo Battey).
 - 8.- *Mycobacterium de rápido crecimiento*
(Grupo Runyon IV) (incluyendo al *M.*
fortuitum).
-

MORFOLOGIA.

Al microscopio de luz el bacilo de Hansen se presenta en forma de un bastoncillo ligeramente incurvado de 1.5 a 6 micras de largo y 0.2 a 0.45 micras de ancho, en cuya parte central se encuentra durante su ciclo evolutivo, formas granulosas de 0.3 micras, que hacen relieve, en número de 1 a 4, análogas a los gránulos de Mich de la tuberculosis y que en el bacilo de Hansen reciben el nombre de gránulos de Lutz-Unna (2-3-9-15).

El bacilo de la lepra puede ser rectilíneo, difteroido y puede tener algunos ensanchamientos, donde se encuentran los gránulos de Lutz-Unna, que se cree sean formas de resistencia estereotípica inespecífica. Los bacilos se agrupan en acúmulos en forma de paquete de cigarrillos, que reciben el nombre de globias y que éstos se aglutinan por una substancia llamada gleea, el M. leprae vive intracelularmente, se supone que se divide por mitosis, porque los bacilos se encuentran unidos por uno de sus extremos. La formación de globias tiene importancia en el diagnóstico ya que éstas se encuentran en los enfermos con lepra lepromatosa y los bacilos se encuentran en forma aislada en los enfermos con

lepra tuberculoide o no se encuentran. En los enfermos tratados hay menos globias, menos ácido-alcohol resistencia y también pueden encontrarse fragmentados, granuloso o en forma de polvo bacilar.

Existe gran parecido morfológico entre el *M. leprae* y el *M. lepraemurium* o bacilo de Stefansky productor de la lepra murina, que no tiene que ver nada con la lepra humana.

Debido a que el *M. tuberculosis* es muy frecuente en el género humano, es importante señalar algunas diferencias que tiene con el *M. leprae*, las cuales se citan en el cuadro No. 3.

DIFERENCIAS ENTRE EL M. LEPRAE Y EL M. TUBERCULOSIS.

<u>M. leprae.</u>	<u>M. tuberculosis.</u>
1.- Más corto y más rígido. Menos regular en su forma.	1.- Más largo y menos rígido. Más regular en su forma.
2.- Se agrupan en globias.	2.- No se agrupan en globias.
3.- Es más infeccioso.	3.- Es menos infeccioso.
4.- El tejido lepromatoso contiene un número mayor de bacilos.	4.- El tejido más tuberculizado, tiene menor cantidad de bacilos.
5.- Es menos ácido-alcohol resistente.	5.- Es más ácido-alcohol resistente.
6.- Cualquier caso lepromatoso abierto es muy bacilífero.	6.- El más contaminante de los tuberculosos es menos bacilífero.
7.- Ocasiona lesiones menos extensas.	7.- Ocasiona lesiones más extensas.

DIFERENCIAS ENTRE EL M. LEPRAE Y AL M. TUBERCULOSIS.

<u>M. leprae.</u>	<u>M. tuberculosis.</u>
8.- El poder patógeno es menor.	8.- El poder patógeno es mayor.
9.- Ocasiona gran cantidad de infectados.	9.- Ocasiona menor cantidad de infectados.
10.-La proporción de enfermos es menor, por su menor patogenicidad.	10.-La proporción de enfermos es mayor, por su mayor patogenicidad.

PORCENTAJE DE SUBSTANCIAS CONTENIDAS POR EL MYCOBACTERIUM
LEPRAE Y EL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

	<u>M. leprae.</u>	<u>M. tuberculosis.</u>
Fosfátidos	2.25 %	6.54
Grasas solubles en acetona	6.47 %	6.20 %
Ceras solubles en cloroformo	9.98 %	11.03 %
Lípidos totales	18.70 %	23.78 %
Polisacáridos	0.92 %	0.87 %
Residuos bacterianos secos	80.38 %	75.01 %

(Cuadro 4)

(70)

INDICE BACTERIOLOGICO Y MORFOLOGICO.

A nadie escapa la importancia que tiene la baciloscopia en el estudio y clasificación del enfermo de lepra, así como para seguir la evolución de la enfermedad y el control de los enfermos.

La búsqueda del bacilo de Hansen en los enfermos de lepra se puede hacer en los frotis o en los cortes histológicos. El material para el frotis se toma de la piel y o de la mucosa nasal y solo rara vez de los nervios y los ganglios. La zona de la piel que se elige para tomar el material, debe ser una zona de actividad con lesiones cutáneas o infiltración y se puede hacer con la técnica siguiente:

1.- Después de la asepsia de la piel elegida, se coloca una pinza de ramas largas protegida con hule, se aprieta sobre el tejido hasta lograr la isquemia, con una aguja hipodérmica se sacan gotas de linfa que se extienden sobre un portaobjetos y se fijan a la flama. Para que el frotis obtenido sea útil y pueda ser estudiado adecuadamente hay que tener en cuenta los siguientes puntos:

a) Que la lesión elegida sea activa, puede ser el lóbu_

lo de la oreja o cualquier lesión dermatológica.

b) Hacer isquemia completa para evitar que salga sangre.

c) Picar profundo en la zona isquemizada.

d) Hacer un frotis delgado.

2.- Después de limpiar la zona de la piel de la cual se va a tomar la muestra, se comprime ésta entre el dedo pulgar y los otros dedos de la mano izquierda a fin de evitar o reducir la hemorragia produciendo isquemia y con una hoja de bisturí o lanceta tomada con la mano derecha se hace una pequeña incisión de 5 mm. de largo por 2 mm. de profundidad y por el lado que no corta el bisturí se raspa varias veces en la misma dirección, los lados y el fondo del corte y el material obtenido que no sea sangre, sino linfa y tejido, se extiende en un portaobjetos y se fija a la flama.

El infiltrado lepromatoso no es superficial, se asienta en la parte inferior de la dermis, por lo que hay que escarificar profundamente.

En la nariz la muestra debe de tomarse de la mucosa del tabique que es donde habitualmente abunda el bacilo y no del moco, se puede hacer con una cucharilla (cucharilla de chalazión) o un estilete, para producir un ligero raspado, sin provocar hemorragias profusas, indicando al enfermo antes de llevar a cabo este procedimiento se suena bien la nariz. El material se extiende en un portaobjetos y se fija a la flama. Si se cuenta con una buena fuente de luz y un espéculo nasal, se podrían ver las lesiones y de allí tomar el material.

En los bacilos puede haber modificaciones en su forma, tinción, aspecto y conformación, debido a las modificaciones biológicas o a efectos del tratamiento, en este último caso, disminuyen el número de globias, posteriormente se fragmentan los bacilos y se hacen gramulosos hasta que desaparecen.

Los estudios que se han efectuado para determinar la viabilidad del Mycobacterium leprae han permitido concluir que solo los bacilos que toman una coloración fuerte y uniforme con la técnica de Ziel-Neelsen son formas vivas e infectantes y que los bacilos coloreados irregularmente son formas degeneradas (3-8-15-22).

La observación del bacilo se hace con el objetivo de inmersión y se utiliza el aceite de cedro para este objeto.

El índice bacteriológico indica la cantidad de bacilos y el índice morfológico expresa el porcentaje de formas sólidas entre el total de los contados y da la viabilidad y el exponente de la respuesta al tratamiento.

Ejemplos:

Índice bacteriológico.-

Más de mil bacilos por campo XXXXX.

De cien a mil bacilos por campo XXXX.

De diez a cien bacilos por campo XXX.

De uno a diez bacilos por campo XX.

De uno a diez bacilo en diez campos X.

De uno a diez bacilos en cien campos X.

Ningún bacilo en cien campos es igual a negativo.

Índice morfológico.-

Nos expresa el porcentaje de bacilos sólidos de

200 bacilos encontrados y no en globias.

0 - 20 %

20 - 50 %

50 - 75 %

75 - 100 %

El sitio de donde se tome la baciloscopia debe de ser el mismo en el curso de la evolución de la enfermedad y durante el tratamiento. Se debe de tomar en cuenta si el sitio de donde se toma la biopsia es un sitio seboreico, porque pueden haber en esos sitios bacilos ácido-alcohol resistentes, semejantes a los hanseianos.

También hay que tomar en consideración que la mucosa nasal es atacada tardíamente y solo en tipo lepromatoso, así que esta investigación no tiene valor para el diagnóstico temprano de la enfermedad. No hay duda que la mucosa nasal es importante en la localización del bacilo y en la transmisión de la lepra; en los casos lepromatosos antes de instituir el tratamiento el índice morfológico es más alto en la nariz que en la piel, por lo que en la práctica, esta investigación es una forma rutinaria, junto a una o dos tomas de las lesiones de la piel enferma.

Algunos autores recomiendan que no se haga la baciloscopia nasal, por las razones que a continuación citamos:

- a) Es incómoda para el paciente.
- b) En la nariz pueden haber micobacterias no patógenas aun en la personas sanas.
- c) El bacilo puede estar ausente de la mucosa nasal si está ausente de las lesiones de la piel.
- d) El bacilo puede estar ausente de la mucosa nasal en los casos dimorfos.
- e) Cuando el bacilo está presente en la mucosa nasal y desaparece después que en la piel en los pacientes bajo tratamiento, puede dar una falsa relación con el tratamiento(2-6-43-44-68).

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Las observaciones al microscopio electrónico han demostrado nuevas estructuras, condensaciones y ramificaciones en forma de "Y". Los estudios realizados por Mr. Fadsen, Valentine y Bridge, Hanks, Imada, Gay-Prieto y Rubio Huertas, permitieron observar que el M. leprae está rodeado por una membrana que penetra en forma de red en el interior del protoplasma bacilar (Fig. 2), esta membrana está compuesta por dos capas y no se sabe si es el resultado del metabolismo celular.

En el citoplasma existen unos cuerpos redondos, muy osmiofilos que son los nucleolos. En el estudio de globias realizado por Rubio Huertas y Gay-Prieto, se pudo observar la presencia de numerosos cuerpos mielínicos y alteraciones de las crestas de los cromosomas. Así como también cuerpos polares en ambos extremos (6-9-15-17-26).

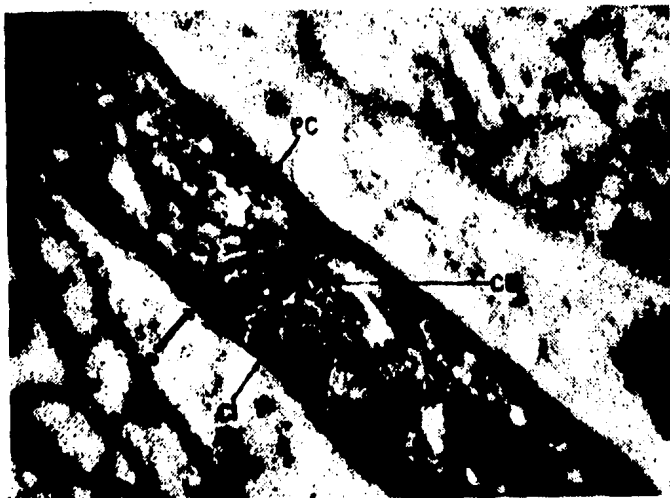
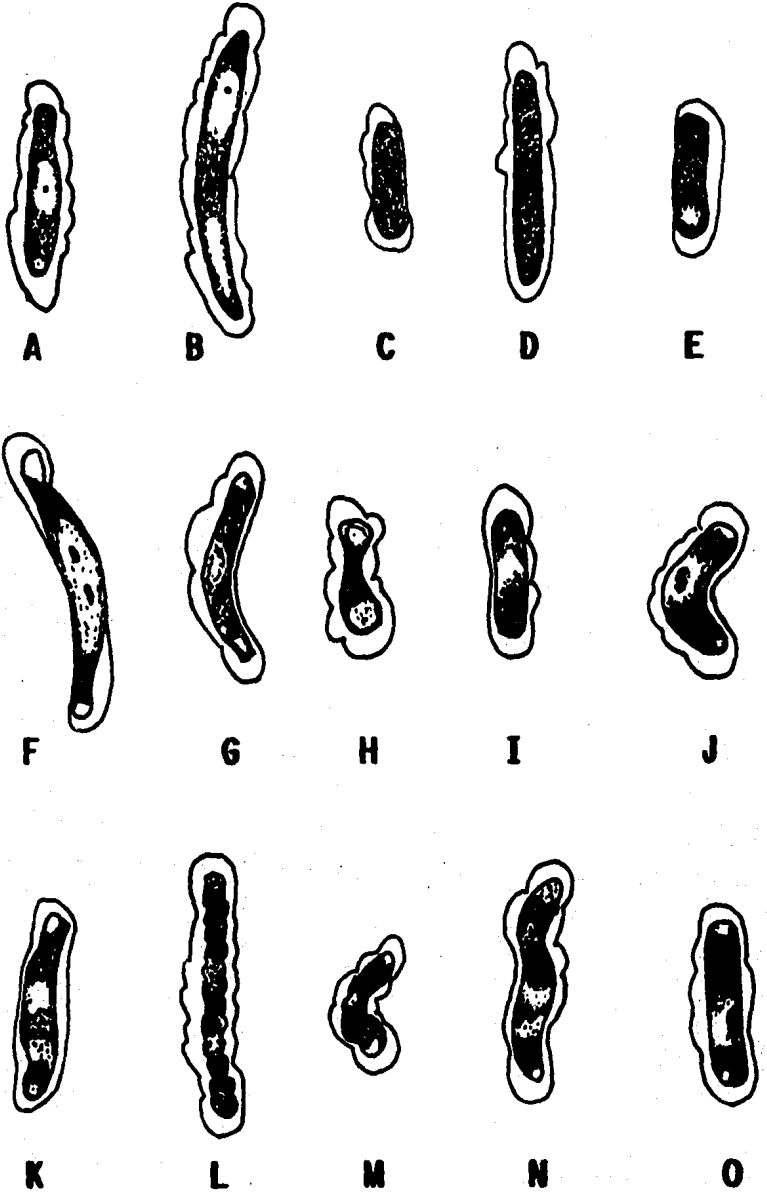


Fig. 2.- Se observa un bacilo proveniente de un caso dinorfo de lepra donde puede verse el sistema intracito plásmico de la membrana plasmática (M.P.) compuesto de la capa externa (C.E.) que encierra la capa interna (C.I.) arborizada de dicha membrana. El sistema intra citoplásmico que se observa en las micobacteriáceas está formado por una invaginación de los componentes (Capa externa e interna) de la membrana plasmática, que puede observarse como brazos paralelos con parte intermedia clara, inmediatamente por dentro de la pared celular (D.C.) (Microscopía electrónica. Dres. T. Imaeda y J. Convit).



(FIG. 3)

Fig. 3.- Esquema de las formas aisladas del *M. leprae* al microscopio electrónico: A) Forma típica con condensaciones polares y halo periférico; B) Forma larga; C) Forma corta sólida; D) Forma larga sólida; E) Forma sólida con un segmento permeable; F) Forma en ese itálica con condensaciones polares; G) Forma bipolar encorvada; H) Forma con condensación central; I) Forma bipolar recta; J) Forma bipolar encorvada corta; K) Forma grande con tres gránulos; L) Forma grande multigranular; M) Forma granular corta; N) Forma larga sinuosa con granulaciones; O) Forma con condensaciones de tipo oblicuo.

COMPOSICION QUIMICA.

La composición química del M. leprae es compleja (Cuadro 5). Dentro de él se encuentran los ácidos grasos de alto punto de fusión y uno de ellos llamado ácido leprosofínico que parece ser el responsable de la ácido resistencia, parece ser que los grupos carboxil principalmente los hidroxilos de los ácidos grasos son esenciales en la ácido resistencia.

Los lípidos son los constituyentes principales del bacilo, ácidos grasos, grasas neutras, fosfátidos y cuerpos ceroides, también se presentan proteínas e hidratos de carbono. Todas estas sustancias son antigénicas e intervienen con el estado inmunológico del paciente para producir la aceptación o destrucción del bacilo.

Los gránulos de Unna están constituidos por ácidos nucleicos o nucleoproteínas y la glicina está constituida por lípidos homogéneos (2-12-15-17).

COMPOSICION QUIMICA DEL M. LEPRAE.

- 1.- Grasas neutras.
 - 2.- Acidos grasos (Acido leprosinico).
 - 3.- Lecitinas.
 - 4.- Fosfátidos.
 - 5.- Ceras.
-

(Quadro 5).

BIOQUÍMICA.

En 1966, el Dr. K. Prabhakaran, jefe del departamento de investigación de Carville, comunicó que el bacilo de Hansen tiene la capacidad de oxidar el aminoácido Dopa (3, 4 dihidroxifenilalanina) en angel 5, 6 quinona, también es capaz de oxidar otras sustancias que ésto es común con otras micobacterias. Posteriormente Kirschheiser y Prabhakaran hicieron lo mismo con el M. tuberculosis, M. bovis, M. marinum, M. fortuitum, M. ulcerans, M. phlei y M. lepraemurium no realizándose el efecto dopa-oxidasa en estas micobacterias, por lo que ahora se afirma que el efecto dopaoxidasa es identificador del M. leprae y es la única propiedad bioquímica específica del M. leprae. El rasgo de oxidar otras sustancias es lo que hace la diferencia con otras células de la piel (31-55-63).

Algunas investigaciones realizadas por Kato y colaboradores han querido demostrar que la oxidación de dopa solo ocurre en presencia del ácido hialurónico. Ellos dicen que tienen evidencia indudable de que el ácido hialurónico no solo oxida la dopa sino que la convierte en pigmento, lo que es idéntico a la actividad fenolasa

que presenta el bacilo de Hansen.

Estos investigadores llegaron a la conclusión de que el ácido hialurónico solo o la piel del ratón digerida por la tripsina, también exida la Dopa y por eso hay razón para creer que los constituyentes de la piel, probablemente el ácido hialurónico y no los bacilos son los responsables de la formación del pigmento.

Con respecto a lo anterior hay que tomar en cuenta que el ácido hialurónico es un polisacárido y que los polisacáridos no son enzimas ya que todas las enzimas son proteínas; esto fue aseverado a principios de siglo por Sunner y Northrop y por ésto les fue otorgado un Premio Nobel (55-63).

Se han hecho investigaciones acerca de el efecto de la vitamina "C" en el crecimiento del bacilo de Hansen, este estudio se inició después de que Futsuo y colaboradores reportaron la regresión marcada de las lesiones de un enfermo de lepra lepromatosa, que había estado ingiriendo 1.5 g. de ácido ascórbico diariamente por cuatro meses, en ausencia de cualquier quimioterapia específica contra *M. leprae* (25).

Sabiendo ésto el Dr. Hastings inoculó ratones en la almohadilla plantar y posteriormente a los 6 meses a unos les dió D.D.S. (diaminodifenilsulfona), clofasimina y rifampicina y a otros les administró ácido ascórbico, concluye el Dr. Hastings como resultado de su investigación, que los datos obtenidos si apoyan la teoría de Matsuo y que la vitamina "C" puede tener actividad antibacteriana contra el *M. leprae* (25).

III LEFRA EXPERIMENTAL

INTENTOS DE INOCULACION A HUMANOS

La puerta de entrada del bacilo de Hansen todavía no se ha establecido. Una de las teorías es que el bacilo penetra por erosiones o hendiduras de la piel y esta teoría está apoyada por haber hallado *M. leprae* en artrópodos como mosquitos, piojos y el agente productor de la escabiasis, pero este hecho está considerado como poco probable por otros autores (35-44-48-50).

Se ha demostrado que el sitio original de su multiplicación es la piel y la teoría de su diseminación por vía aérea aunque afirmada por muchos, no se ha probado hasta ahora (17).

El primer intento de inoculación del que se tiene constancia fue efectuado por Armauer Hansen descubridor del bacilo que hoy lleva su nombre, él trató de inocular el bacilo en el ojo de una mujer y ésto le causó la suspensión de sus actividades como médico (2).

Posteriormente hubieron otros intentos de inoculación que van desde Danielsen, Profeta, Mouritz y Begelli, entre 1883 y 1884, hasta el intento de inoculación de Arning, quien inculó el bacilo de la lepra en un indio

na condenado a muerte y veinticinco meses después, éste desarrolló nódulos lepromatosos, sin embargo más tarde, se supo que había convivido con familiares enfermos de lepra. En 1934, se sabe que Marchoux accidentalmente hirió con un bisturí a uno de sus ayudantes en el dedo, mientras operaba a un enfermo de lepra lepromatosa y que ocho años después el ayudante desarrolló lesiones de lepra en la misma mano, comprobándose después por medio de biopsia la presencia del bacilo (43-44-70).

En 1937 Lagoudsky se autoinoculó con sangre de paciente lepromatoso y dijo que dos meses después desarrolló lesiones anestésicas. Nunca sanó de la enfermedad, pero el médico tenía pacientes lepromatosos que vivían en su casa y pudo haberla adquirido mucho antes (44-70).

Mouritz inoculó quince voluntarios humanos con material lepromatoso controlandolos por veintiseis años y todos al cabo de estos años, permanecieron asintomáticos (44-70).

En 1948 Muir presentó el caso de un peluquero, que asentaba la navaja de rasurar en su brazo después de haber afeitado a un enfermo lepromatoso y que después desarrolló la enfermedad en el sitio del traumatismo (43-44-70).

INTENTOS DE CULTIVO

Se ha intentado numerosas veces cultivar al Mycobacterium leprae, se han utilizado diversos tipos de medios para cultivo, medios para M. tuberculosis, medios micológicos, medios sintéticos y medios conteniendo factores de crecimiento, medios en aerobiosis y anaerobiosis, sin que al parecer se haya podido cultivar el bacilo de Hansen.

Botberg y Becheli en su tratado de leprología (1951) citan: Bordoní y Uffranssi (1888) sembraron el material obtenido de pacientes de lepra en medio de suero sanguíneo-peptona-glicerina, obteniendo un germen difteroide, el cual no reproducía la enfermedad en los animales de laboratorio; en ese mismo año obtuvieron los mismos resultados Gianturco y Babes (70).

Levy en 1897 refiere el crecimiento de bacilos difteroides, después de quince días de haber sembrado el material obtenido de lepromas de un enfermo lepromatoso, en medio de agar-glicerina-suero sanguíneo (70).

Szronk cultivó en 1898 unos bacilos difteroides a partir de material de un leproma sembrado en medio de papa-glicerizada y posteriormente resembró los mismos bacilos en agar-suero sanguíneo, intentando posteriormente indentificar al bacilo, sometiendo a pruebas de aglutinación con suero sanguíneo de pacientes lepromatosos, haciendo diluciones desde 1:60 a 1:1 000, obtenien pruebas positivas de aglutinación.

Kedrowsky intentó cultivar el bacilo en 1 900 cambiando el medio de cultivo a agar-extracto de placenta, obteniendo también bacilos difteroides, los que perdían su ácido-alcohol resistencia en los cultivos subsiguientes, conservando sus granulaciones. También Klitan (1905), Bayón (1911-1912), Williams, Dival y Wellman, Stasiale (1915) y Walker en 1922 intentaron cultivar al bacilo de la lepra obteniendo los mismos bacilos difteroides (70).

Posteriormente en 1904 se empezaron a obtener bacilos en colonias pigmentadas, así Rost reporta haber cultivado al bacilo de la lepra en caldo de carne sin cloratos y otros en ese mismo año reportan haberlo cultivado en un caldo de dializado, obteniendo una colonia filamentos, blanca o algo amarillenta (70).

Clegg en 1909 en Filipinas, sustentó la hipótesis que los bacilos de Hansen se nutren a partir de sustancias de desecho metabólico del organismo e indica que las amibas serían buenas productoras de estos desechos y así intenta el cultivo en un medio producido de desechos metabólicos de amibas, obteniendo colonias amarillentas con tonalidades que van del color oro hasta color naranja.

Duval y Wellman describieron los resultados que obtuvieron, con un medio de extracto líquido de placenta, en medio líquido y agar-glicerinado y lograron aparentemente identificar al bacilo por medio de serología (70).

Hay que hacer incapie que todos los intentos anteriores los autores obtuvieron bacilos ácido-alcohol resistentes y que las colonias eran pigmentadas por lo que se clasificaron estos bacilos como *Mycobacterias* cromógenas.

Ahora trataremos de resumir los intentos más interesantes acerca de cultivos donde se obtuvieron colonias sin color por lo que se clasificaron como *Mycobacterias* no cromógenas.

Weil en 1905 en caldo peptonado-glucosado-agua de mar-liquido ascítico lo intenta, Ducrey y Mc. Coy hace lo mismo obteniendo bacilos ácido-alcohol resistentes, en colonias no pigmentadas (70).

Ahora citaremos estudios más recientes sobre el cultivo del M. leprae entre los que se encuentran los efectuados por Giordano en 1929, Souza-Araujo en ese mismo año, Lowenstein, Szary y otros muchos más que refieren haber cultivado al M. leprae, obteniendo colonias de bacilos ácido-alcohol resistentes sin haber identificado a ciencia cierta si se trataba del bacilo de Hansen (44-70).

TRANSMISION EXPERIMENTAL DE LA LEPRO A LOS ANIMALES

Los ensayos de transmisión experimental del M. leprae a los animales ha tenido una gran dificultad, durante los siglos XIX y XX, han habido numerosos intentos de inoculación entre los que podemos citar a los efectuados por Neisser en 1881, Hansen en ese mismo año y Charles Nicole en 1905, todos estos autores lo intentaron en el Macaco sinicus; Marchoux de 1908 a 1925 hace el intento en el Macacus rhesus por su cercanía zoológica con el hombre; Ota y Sato en 1931 hacen inoculaciones en ratas blancas (70).

Hadler de 1937 a 1938 señala la posibilidad de inocular al hamster sirio esplenectomizado (21).

Después de numerosos ensayos, Chaussinand logra enfermar al cobayo, observando nódulos lepromatosos en colon transverso y la nuca de este animal donde se había efectuado el inóculo, indicándonos en su publicación, que el nódulo se rodea de tejido neoformado muy vascularizado y que en su interior los gérmenes se multiplicaron.

También se ha tratado de inocular al *Mycobacterium leprae* en animales de sangre fría, como el intento de Chaussinand y Besse al tratar de infectar peces, el bacilo fue inculado intraperitonealmente, muriendo los peces en un tiempo que varió entre uno y dos años; en la autopsia se observó minúsculas granulaciones conteniendo numerosos bacilos ácido-alcohol resistentes (10).

Binford en 1956 inculó bacilos de Hansen en 1 500 roedores y treinta y un monos; catorce hamsters y de todos solo cuarenta sujetos presentaron la infección local y en muy pocos casos se observó la invasión a filetes nerviosos. El autor de esta inoculación masiva, insiste en la predilección del *M. leprae* por los sitios de temperatura fría (44).

Chatarjee en 1955 reporta la transmisión de la infección leprosa a ratones híbridos seleccionados, estos fueron inculados subcutáneamente con una suspensión de *M. leprae* libre de tejidos. La enfermedad generalizada apareció después del octavo mes de la inoculación, el bacilo se observó en hígado, ganglios linfáticos, testículos, piel y nervios; posteriormente este mismo autor obtuvo la enfermedad generalizada, transmitiendo el bacilo de ratón a ratón. Eliminó la posibilidad de que se tratara

de otras micobacterias, cultivando los bacilos en medios específicos para otras micobacterias, no creciendo en los medios de cultivo empleados. Preparó lepromina a partir de los bacilos obtenidos y comparó su efecto con lepromina humana, siendo semejante el resultado (9).

Many Bergel en 1959 inoculó bacilos obtenidos de un paciente lepromatoso en ratones y ratas negras sometidas a una dieta prooxidante, libre de vitamina "E" y rica en aceite de lino y de hígado de bacalao. La inoculación la efectuó en la almohadilla plantar y en los testículos y obtuvo después de seis meses una intensa multiplicación de los gérmenes y así nos indica que la dieta prooxidante favorece la multiplicación del *M. leprae* (44).

En 1962 Mason obtuvo el mismo resultado en el testículo de rata, repitiendo el mismo experimento pero inoculando hamster, posteriormente siempre obtuvo buenos resultados (44).

En 1960, Shepard inoculó ratones en la almohadilla plantar, 0.03 ml de una suspensión de bacilos de Hansen, preparados a partir de secreciones nasales de un enfermo lepromatoso no tratado; dos a seis meses después de la

inoculación aparecieron lesiones histopatológicas granulomatosas constituidas por macrófagos, células epiteliodes, linfocitos, estas lesiones granulomatosas contenían bacilos ácido-alcohol resistentes (44).

En el VIII Congreso de Leprología en Río de Janeiro en 1963, el comité técnico reunido para estudiar la transmisión experimental de la lepra a los animales, consideraron que la infección específica obtenida por Shepard, al inocular a los ratones blancos en la almohadilla plantar, es lo más práctico, ya que ésto ha podido ser repetido en varios laboratorios, con bacilos de Hansen tomados de enfermos lepromatosos de diversas partes del mundo. Concluyen también que los sitios donde se puede ingcular a ratones y hamsters son los sitios fríos como las orejas, almohadillas plantares y testículos (44).

Entre los inconvenientes de la inoculación a la almohadilla plantar del ratón se encuentran: que la multiplicación es limitada y la enfermedad se encuentra restringida al sitio de la inoculación. Esto caebia si el ratón de experimentación se encuentra inmunosuprimido ya que en éstos la enfermedad se torna generalizada y hay

aparición de bacilos hasta en mucosa nasal. Algunos de los métodos para inducir la inmunosupresión son la tinea_c toña y la irradiación con dosis de 900 rads y trasplan_{te} te posterior de médula ósea (50-65).

EL ARMADILLO

En el año de 1971 el Dr. W. F. Kirchoheimer, jefe del laboratorio de investigación de lepra de la ciudad de Carville, Louisiana E.U.A. y la Dra. Eleanor Storrs, publicaron haber inoculado algunos armadillos de nueve bandas (*Dasyus novemcinctus*, Linn.) con buenos resultados. Indican en su publicación que el armadillo tiene ventajas sobre el ratón, las cuales son: 1.- El armadillo tiene una vida media de doce a quince años. 2.- Tiene una temperatura rectal de 30 a 36° C. y es poiquilotermo. 3.- Tiene una forma de reproducción monocigota propiciando que se pueda hacer la replica del experimento en animales genéticamente idénticos (33).

El armadillo se puede inocular con la suspensión de bacilos, subcutáneamente en el abdomen y además en las orejas, el modo de preparar la suspensión es la siguiente:

- 1.- Se toma la biopsia de un enfermo lepromatoso no tratado.
- 2.- Se quita la epidermis a la biopsia.

- 3.- Se lava el espécimen por tres ocasiones con agua destilada.
- 4.- Se corta el tejido en múltiples ocasiones con unas tijeras.
- 5.- Se tritura el tejido en un mortero añadiendo solución de Hanks poco a poco hasta completar 5 ml.
- 6.- Se centrifuga, en una centrifuga refrigerada a 220 x g. por 10 minutos.
- 7.- Remueva las substancias grasas sobrenadantes con una torunda estéril.
- 8.- Transfiere el sobrenadante con una pipeta de válvula magnética.
- 9.- Triture el residuo y resuspenda en solución de Hanks (5 ml.).
- 10.- Centrifuge a 220 x g. por diez minutos.
- 11.- Transfiere de nuevo el sobrenadante.

- 12.- Añada a la solución 6 ml. de tripsina al 0.05 % por cada 10 ml. de suspensión.
- 13.- Agite suavemente a 30° C. por 30 minutos.
- 14.- Centrifuge en la centrifuga refrigerada a 220 x g. por cinco minutos.
- 15.- Desaloje el sobrenadante y centrifuge a 2 700 x g. por treinta minutos.
- 16.- El residuo contiene las Mycobacterias listas para inocular.

Catorce meses después de la inoculación se le diagnosticó al armadillo lepra lepromatosa, basandose en el aumento de más de mil veces del número de bacilos inoculados, las bacterias no crecieron en medio de Lowstein y las bacterias oxidaron la Dopa, prueba específica para identificar al *M. leprae*. Las bacterias ácido-alcohol resistentes fueron encontradas lejos de los sitios de inoculación, éstas eran intracelulares y las células eran histiocitos baculados; también se observaron bacilos en nervios cutáneos. En publicaciones posteriores se ha

comprobado que en los hombres como en el armadillo existe una resistencia diferente que varía de individuo a individuo (30-39).



ARMADILLO

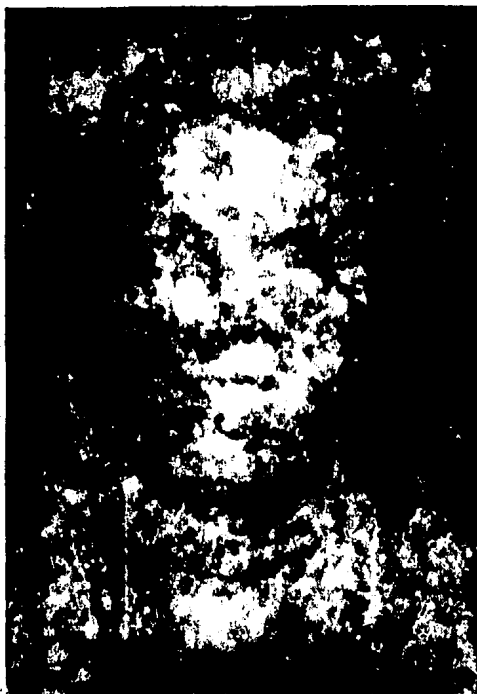
(DASYPUS NOVEMCINCTUS)

(Fig. 4)



WALDEMAR F. KIRCHHEIMER.

(Fig. 5)



ELEANOR STORRS

(Fig. 6)

IV METODOS DE TINCIÓN

GENERALIDADES

Las dos características más importantes del bacilo son, su afinidad por los colorantes básicos (fucsina, violeta de metilo, violeta de genciana, etc.), con no decoloración de la fucsina por acción de soluciones ácidas o alcohólicas y su coloración positiva con tinción de Gram (15).

El bacilo de Hansen a través de su estudio ha sido coloreado por medio de diferentes métodos, entre ellos el de Ziehl Neelsen, Gram, Wergler y Mich. Este bacilo que es Gram positivo y ácido-alcohol resistente en mayor grado que el bacilo de Koch, se diferencia de este por medio de la tinción de Bausgarten (Cuadro 6). Coloreando de rojo al *M. leprae* y quedando incoloro el bacilo de la tuberculosis (17).

TÉCNICA DE ZIEHL-NEESEN Y FITE-FARACO

La técnica de Ziehl-Neelsen (Cuadro 7), ha dado resultados más pobres con relación a la tinción del bacilo si la comparamos con la técnica de Fite-Faraco. La principal diferencia estriba en la cantidad de bacilos que se demuestran entre una y otra técnica. Notándose

gran escases de bacilos con la técnica de Ziehl (17)
y por lo contrario una enorme cantidad con la técnica
de Fite.

La explicación que se da a este fenómeno según los
trabajos revisados es variable, unos dicen que los baci
los pierden su ácida resistencia debido al proceso que
sufre el tejido durante su deshidratación e inclusión en
parafina. Para otros el problema estriba en el desprend
imiento de los bacilos de los tejidos, a causa de las
violentas interacciones entre el xilol, alcohol y el
agua, por eso se idearon técnicas de desparafinación len
ta utilizando aceites y grasas. Faraco impregnó cortes
con grasa de gallina antes de teñir los cortes y deja
para lo último la desparafinación con xilol y alcohol.
Fite desparafinó antes de teñir con una mezcla de xilol
y aceite de oliva, o de xilol y aceite de cacahuate o
algún otro aceite como el de algodón o también petrola-
to químico. Obteniéndose mejor contraste con la técnica
de Faraco, pero como utilizó para decolorar una solución
alcohólica de ácido clorhídrico, hizo que se desprendier
an numerosos bacilos, reteniéndose mayor cantidad de
bacilos con la técnica de Fite.

PROCEDIMIENTO DE BAUMGARTEN

- 1.- Solución alcohólica saturada de fucsina 1 gota/cm³
de agua destilada. (7 minutos) (procedimiento de
coloración).

- 2.- Alcohol nítrico al 1/3 (15 a 30 segundos) (decolo
ración).

- 3.- Azul de metileno en solución acuosa muy diluida
(contraste).

(Cuadro 6)

(17)

COLORACION DE ZIEHL-NEELSEN

- 1.- Fijar el frotis al calor.
- 2.- Cubrir de Carbol-fucsina. Calentar suavemente durante 5 minutos, sobre la llama directa o durante 20 minutos en un baño de agua.
- 3.- Lavar con agua.
- 4.- Decolorar en alcohol ácido, hasta que solo permanezca una coloración rosada tenue.
- 5.- Lavar con agua.
- 6.- Teñir con azul de metileno de Loeffler por 10 a 30 segundos (coloración de contraste).
- 7.- Lavar con agua y dejar secar.

Según el Dr. Antonio Reyes, del Centro Anticanceroso de Yucatán, la técnica que mayor resultado ha proporcionado es una variante de las técnicas de Fite y Faraco (Cuadro 8), porque se substituye el alcohol clorhídrico para decolorar y se utiliza una solución acuosa de ácido sulfúrico, con lo que se logra retener una misma cantidad de bacilos que con la técnica de Faraco, con mejor diferenciación y con contraste más uniforme, substituyendo el azul de metileno por verde claro amarillento. Con el método de la variante de Fite-Faraco se pueden observar los bacilos ácido resistentes de color rojo brillante y las estructuras de color verde (66).

VERDE MALAQUITA-FUCSINA

La coloración de verde malaquita-fucsina ideada por Murahashi, para hacer la diferencia de bacilos ácido-alcohol resistentes vivos y muertos, fue aplicada al bacilo de la lepra. Al colorearse los bacilos con verde de malaquita al 1 % disuelta en 0.2 ml. de acetato de buffer a un pH de 4.3, se demostró la presencia de sustancias basofílicas que fueron liberadas desde el bacilo de la lepra, después de haber sido calentados a 60° C. en presencia del colorante. Después de varios exámenes

METODO DE DECOLORACION DE LA VARIACION DE FITO-FARACO

- 1.- Desparafinar los cortes con la mezcla de xilol-acetate de oliva, dos cambios de 5 minutos c.u.
 - 2.- Escurrir y secar las láminas con papel filtro.
 - 3.- Lavado con agua corriente por 5 minutos.
 - 4.- Teñir con solución de Fenol-fucsina, por 20 minutos a temperatura ambiente.
 - 5.- Lavado con agua corriente.
 - 6.- Decolorar con solución acuosa de ácido sulfúrico al 5%, de 2 a 5 minutos, procurar que las láminas tomen un color rosa pálido.
-

METODO DE DECOLORACION DE LA VARIACION DE FITE-PARICO

7.- Lavar con agua corriente por 10 minutos.

8.- Contratar con solución de verde claro amarillento.

9.- Secar las láminas con papel filtro y dejar secar com
pletamente durante una hora a temperatura ambiente.

10.- Montar en bálsamo de Canadá o goma Damar o cualquier
medio sintético.

histoquímicos se determinó que esas sustancias basofílicas no eran DNA., sino lípidos presumiblemente derivados de la oxidación de ácidos grasos insaturados. La presunción de que el verde de malaquita combina con el DNA, altamente polimerizado a pH 4 no es válida para el bacilo de Hansen y por eso la coloración del verde de malaquita no puede ser aplicada para hacer la diferenciación entre el bacilo vivo del muerto (29-29).

CARBOL-FUCSINA-NIGROSINA

Hay otras técnicas de coloración que sirven para observar la membrana del bacilo como la de carbol-fucsina-nigrosina. Se fija el frotis al calor, luego se expone al carbol-fucsina por 5 minutos a 37°C. y posteriormente se le da contraste con nigrosina, observándose después al microscopio, la cápsula del bacilo con bordes bien definidos (15).

TECNICA DE HARADA

Existe el procedimiento alocrómico ideado por Harada (23), con el cual se ha efectuado un estudio comparativo con la tinción de Fite-Faraco modificada en el Centro Dermatológico Pascua, por la Dra. Echaniz, la cual

concluyó en su estudio: que con la técnica de Harada el bacilo es más evidente y como un recurso más podría utilizarse este nuevo método para la búsqueda del bacilo y así llegar a un diagnóstico integral definitivo (15).

SUDAN III

La importancia de la coloración de lípidos con sudan III, estriba en que casos considerados clínicamente como indeterminados revelan que histológicamente son lepromatosos debido a la presencia de lípidos componente del bacilo y que también en la lepra lepromatosa se presenta la degeneración lipídica de la célula de Virchow, siendo ésta más aparente por medio de esta técnica (3-20-52).

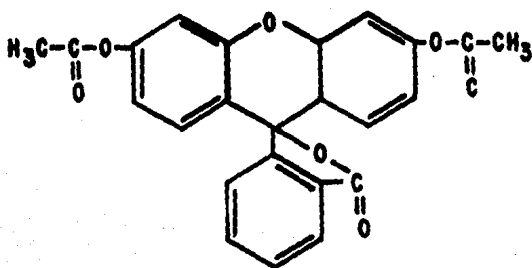
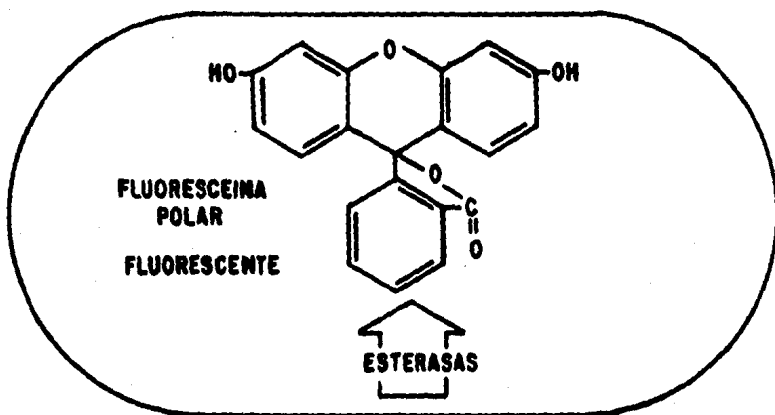
IV FDA/MS METODO PARA MEDIR LA
VIABILIDAD DEL MYCOBACTERIUM
LEPRAE.

DIACETATO DE FLUORESCEINA/BROMURO DE ETIDIO

Con el propósito de desarrollar un método cuantitativo, fácil, rápido y eficaz para determinar si el Myco
bacterium leprae está vivo o muerto, se ha estudiado un
método de tinción fluorescente, el cual previamente se
ha utilizado para medir la viabilidad de células de mamí
feros (54-69). Este procedimiento se empleó con ante
rioridad para medir la viabilidad y daño celular de diver
sos tipos de células (13-16-42), polen (25), esporas
(46) y bacterias (53). Por último ha sido utiliza
do para medir la viabilidad de micobacterias (42-27).

En el estudio de los Drs. James T. Kvach y José R.
Veras, confirman las anteriores experiencias y agregan
el concepto de células duales, que son las que se encuen
tran entre la vida y la muerte (42).

Este método de tinción incorpora el uso de un éster
de fluoresceína, que es el Diacetato de Fluoresceína
(FDA) y el Bromuro de etidio (EB). El FDA no polar,
entra en las células vivas donde es hidrolizado por la
acetilesterasa hasta fluoresceína, que es polar y fluo
rescente bajo la luz ultravioleta y que se acumula rapi
damente en el citoplasma. Estas células se observan de

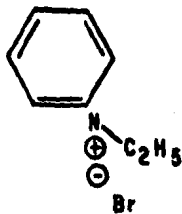
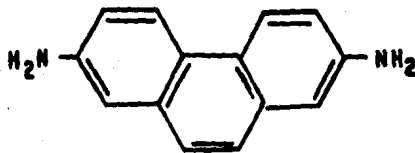
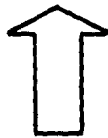
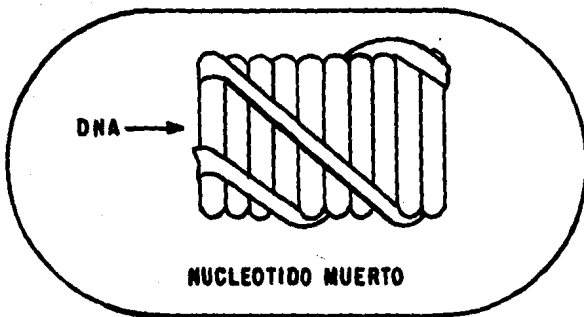


(FIG. 7)

color verde (Fig. 7). El bromuro de etidio tiene capacidad de penetrar a las células muertas y se intercala entre las moléculas de DNA. Estas células se ven de color rojo bajo la luz ultravioleta (Fig 8).

Las células son por lo tanto, identificadas por que poseen acetilesterasa funcional y por excluir al EB, cuando están vivas y cuando están muertas, por carecer de acetilesterasa y por su incapacidad de excluir al EB.

Los estudios de los Drs. Kvach y Veras revelan que el *M. leprae* crecido en el armadillo posee acetilesterasa por lo tanto se tinte de verde, cuando está vivo (41). Las suspensiones de *M. leprae* expuestas a condiciones fisicoquímicas adversas, contuvieron altas concentraciones de microorganismos teñidos de color rojo, como se esperaba en el caso de células muertas; por lo tanto es posible aplicar esta técnica como una forma segura para evaluar la viabilidad del *Mycobacterium leprae*.



BROMURO DE ETIDIO

(FIG. 8)

OBJETIVOS

- 1.- Revisión histórica y taxonómica del *Mycobacterium leprae*.
- 2.- Revisión sobre intentos de cultivo, inoculación al género humano y a los animales del *Mycobacterium leprae*.
- 3.- Revisión sobre métodos de tinción.
- 4.- Aplicar el método FDA/EB por primera vez en México.
- 5.- Evaluar con el método FDA/EB pacientes de lepra no tratados.
- 6.- Evaluar con el método FDA/EB a pacientes de lepra ya tratados.

Dentro de estos objetivos, queda implícita la hipótesis general de este estudio: El FDA/EB puede ser un método cuantitativo para medir la viabilidad del *Mycobacterium leprae*.

Este método puede ser de gran utilidad para el clínico, como para el investigador básico. Para el primero, en la evaluación del tratamiento y para el segundo en la evaluación de medios de cultivo, sin esperar a practicar métodos como son la inoculación al armadillo y al cojine te plantar del ratón.

MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron 14 pacientes del Centro Dermatológico Pascua y detectados en el comando al estado de Mayarit, a todos se les efectuó historia clínica con la sospecha de que eran enfermos de lepra, también se les efectuó estudio histopatológico, aplicación de lepromina, baciloscopia del lóbulo de la oreja y a algunos baciloscopia de mucosa nasal y lesión cutánea.

Se obtuvo tejido infectado de los pacientes por medio de biopsia bajo anestesia local con lidocaina y se mantuvo congelado el tejido por mes y medio en solución de fosfato a pH de 7.2, algunos tejidos fueron incluidos en Tissue-tec y congelados a -60°C .

Se estandarizó la técnica utilizando *Mycobacterium smegmatis*, los cuales fueron traídos del Hospital John Hopkins y mantenidos vivos en medio de Lowenstein-Jensen a temperatura ambiente.

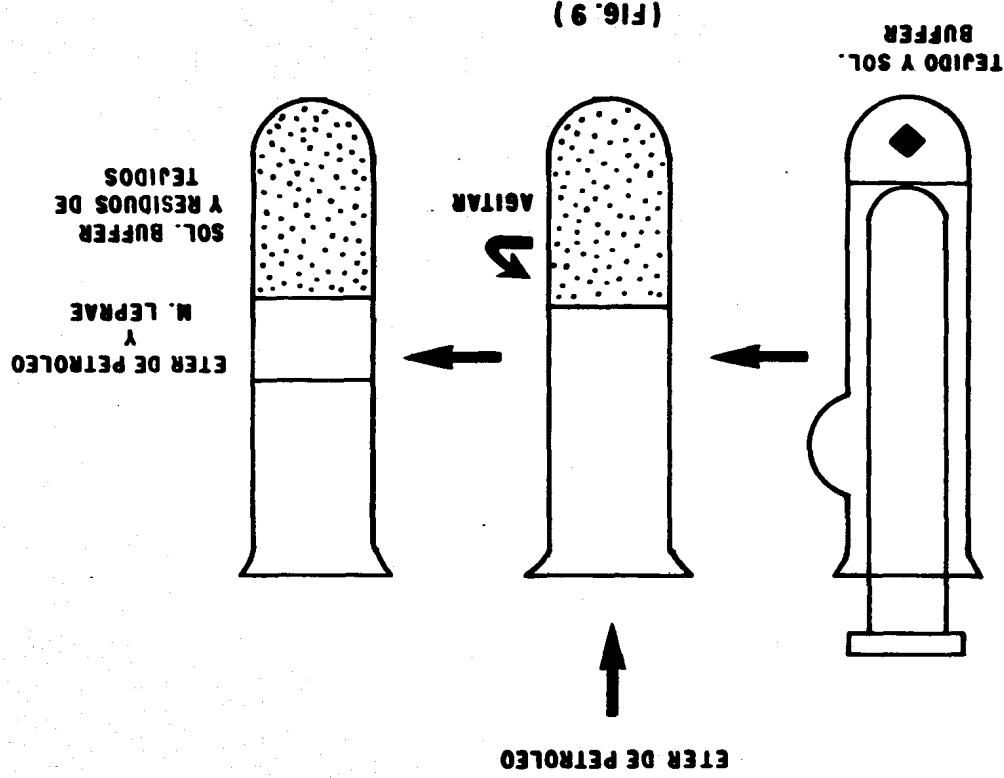
Se descongeló el tejido y a partir de esto se siguieron las siguientes etapas:

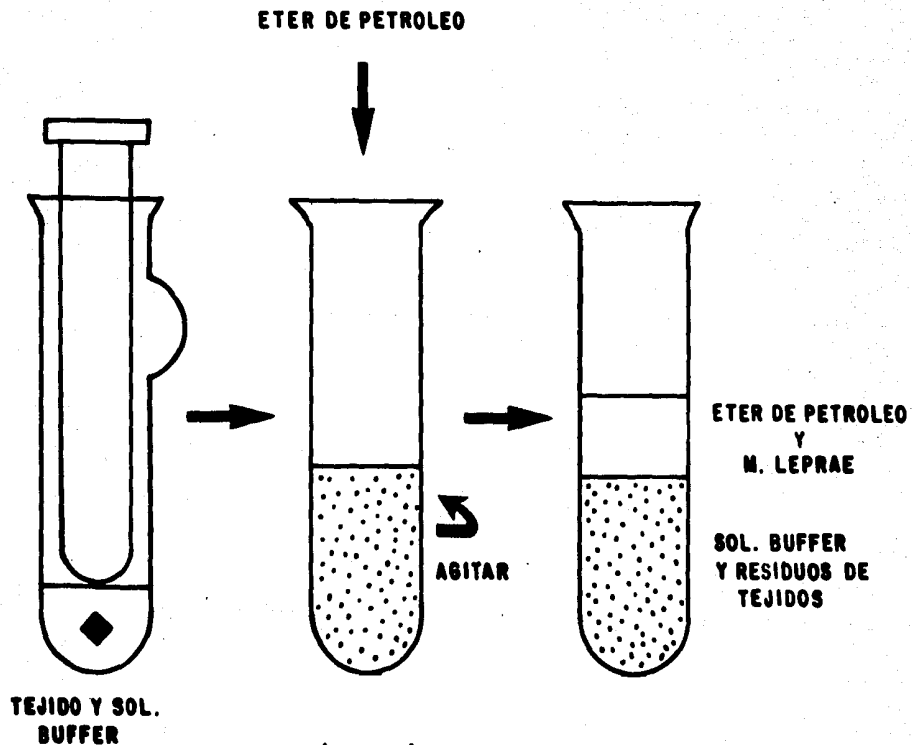
- 1) Preparación de la suspensión de bacterias.
- 2) Técnica de tinción.
- 3) Técnica de lectura e interpretación.

PREPARACION DE LA SUSPENSION DE BACTERIAS.

Se toma tejido humano (Nódulo o pieza de biopsia), se coloca en solución de Hanks (Cuadro 9), con un pH de 7.4, preparada sin rojo fenol y se machaca con un mortero; se resuspende con partes iguales de eter de petróleo y de suspensión de tejidos, se agita y al dejar reposar, el eter de petróleo se va a la superficie llevandose los bacilos (ocurriendo un fenómeno similar al de juntar agua y aceite).

Con el agitado, tanto residuos de tejido como el Mycobacterium lepras pasan através del eter de petróleo, en el que la mayoría de las bacterias son retenidas, mientras que los residuos de tejido caen al fondo. De la capa de eter de petróleo es de donde se van a tomar los bacilos que se van a estudiar (Fig. 9).





(FIG. 9)

SOLUCION DE HANKS

Glucosa	1.0 g.
Cloruro de Sodio	8.0 g.
Cloruro de Potasio	0.4 g.
Cloruro de Calcio	0.14 g.
Sulfato de Magnesio	0.1 g.
Cloruro de Magnesio	0.1 g.
Fosfato Monopotásico	0.06 g.
Fosfato Disódico	0.06 g.
Bicarbonato de Sodio	0.35 g.
Agua Tridestilada	1 litro.

(Cuadro 9)

TECNICA DE TINCIÓN Y DE LECTURA.

Se toma un pequeño inóculo de la suspensión antes mencionada, colocandola en un portaobjetos, se añade una porción idéntica de la solución de trabajo de FDA/EB recién preparada, se le coloca un cubreobjetos y se sella con barniz. Se deja incubar por 30 minutos.

Lista la preparación, se pasa al microscopio de luz ultravioleta y se debe leer con el objetivo de inmersión.

Se deben observar bacterias de colores rojo, para las bacterias que están muertas; amarillo para las bacterias que están entre la vida y la muerte y se les llama también células duales y color verde para las bacterias que están vivas. Se deben contar 200 bacterias y posteriormente calcular el porcentaje de las encontradas.

METODO PARA PREPARAR LA SOLUCION FDA/EB PARA ALMACENAR

FDA .- 100 mg. de FDA (Diacetato de fluoresceína) en
20 ml. de acetona, 5.0 mg/ml.

EB .- 20 mg. de EB (Bromuro de etidio) en 10 ml. de
solución de Hanks.

Almacenar a -20°C . protejiendola de la luz. (Pueden permanecer estables las soluciones hasta 2 años bajo las condiciones antes citadas).

(Quadro 10)

METODO PARA PREPARAR LA SOLUCION FDA/EB DE TRABAJO

FDA:

Diluya la solución almacenada en proporción 1:10 en acetona y ésta puede ser almacenada a -20°C ., protejiendola de la luz.

Para utilizar la solución de FDA hay que diluirla en 5 ml. de solución de Hanks, tomando de la solución anterior 0.02 ml. y se obtendra una solución de FDA de 2 ug./ml.

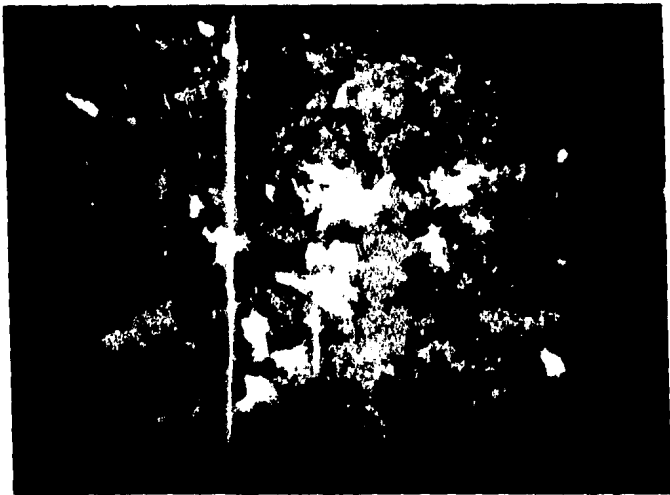
EB:

Para utilizar la solución de bromuro de etidio, añáda a los 5 ml de solución de Hanks que ya tiene FDA, 0.01 ml de la solución de EB que se tiene almacenada y así se obtendrá una solución de FDA/EB con concentraciones de 4.0 ug.EB/ml. y 2.0 ug.FDA/ml.

Protejiendola de la luz y a temperatura ambiente esta solución puede permanecer estable por un día de trabajo.



FDA/EB DEL MYCOBACTERIUM SMEGMATIS.



FDA/EB DEL MYCOBACTERIUM LEPRAE.

(Fig. 10)

VI RESUMEN DE HISTORIAS CLINICAS

Historia: No. 1.
Nombre: U.Z.N.
Sexo: Masculino.
Edad: 60 años.
Estado Civil: Casado.
Ocupación: Agricultor.
Grupo étnico: Mestizo.
Lugar de nacimiento: Escuinapa, Sinaloa.
Lugar de residencia: Acoaposta, Miyarit.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis diseminada a cabeza, tronco y a extremidad superior derecha, de cabeza afecta cara y de tronco ambas caras, de extremidad superior derecha codo.

Morfología: Dermatitis constituida por infiltración, varios nódulos que fluctúan entre 0.5 y 1 cm., se observan cicatrices atróficas de nódulos anteriores.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Presenta alopecia parcial de cejas y vello corporal, pestañas normales. Mucosa nasal hiperémica y congestiona da.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Troncos nerviosos: Presenta engrosamiento de nervios cubitales.

Sensibilidad: Presenta alteraciones de la sensibilidad a la temperatura y al dolor en caras internas de antebrazos.

Alteraciones tróficas: Presenta aplanamiento de ambas eminencias tenar.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de seis años de evolución iniciado con la aparición de "bolitas" en la cara y caída de la "cola de las cejas".

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscopia del lóbulo de la oreja: negativa.

Histopatología: La epidermis presenta atrofia. En toda dermis hay focos aislados de histiocitos vacuolados y linfocitos que rodean vasos y anexos, los que se observan atróficos. Hay una delgada banda de Unna. La tinción de B.A.A.R. muestra bacilos fragmentados y otros azurófilos.

Mitsuda: negativo.

Método FDA/EB: Bacilos rojos 57 %.

Bacilos amarillos 6 %.

Bacilos verdes 37 %.

Diagnóstico: Lepra Lepromatosa Nodular.



Paciente U.Z.N.- Con el diagnóstico de Lepra lepro-
matosa nodular. Observese la cicatriz atrófica de
un nódulo, un área de atrofia y alopecia parcial.

Historia: No. 2.

Nombre: H.C.J.G.

Sexo: Masculino.

Edad: 60 años.

Estado Civil: Casado.

Ocupación: Campesino.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: Buenavista de Trujillo, Fresnillo,
Zacatecas.

Lugar de residencia: Buenavista de Trujillo, Fresnillo,
Zacatecas.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis diseminada a cara, tronco
y extremidades superiores e inferiores.

Morfología: Dermatitis de aspecto monomorfo, cons-
tituida por abundantes nódulos de tamaño variable entre
2 mm. y 1 cm. Algunos nódulos se encuentran aplanados y
hay infiltración en pabellones auriculares.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Cejas, pestañas y vello corporal: normales.

Mucosa nasal: hiperémica y congestionada.

MANIFESTACIONES NEUROLÓGICAS.

Troncos nerviosos: Aparentemente normales.

Sensibilidad: Presenta una zona anestésica en cara dorsal de pie derecho, de aproximadamente 4 cm. de diámetro.

Alteraciones tróficas: ninguna.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de 22 años de evolución, que se inició con la presencia de manchas hipocrómicas, anestésicas en diferentes partes del cuerpo. Ha tomado tratamiento a base de 100 mg. diarios de D.D.S. y 1 200 mg. de rifamicina mensuales.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscopia del lóbulo de la oreja: positiva, una
CRUZ.

Histopatología: La epidermis presenta atrofia evidente. En toda la dermis hay un denso infiltrado formado por células de Virchow, con linfocitos aislados, el infiltrado deja libre una banda de tejido conectivo y rodea vasos y anexos atróficos. La tinción para bacilos muestra numerosos bacilos fragmentados y agrupados intracelularmente y aislados.

Mitsuda: negativo.

Método FDA/EB: Bacilos rojos 46 %.

Bacilos amarillos 4 %.

Bacilos verdes 50 %.

Diagnóstico: Lepra Lepromatosa Nodular.

Historia: No. 3.

Nombre: Q.G.J.

Sexo: Masculino.

Edad: 63 años.

Estado Civil: Casado.

Ocupación: Agricultor.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: Tecuala, Nayarit.

Lugar de residencia: Tecuala, Nayarit.

ESTUDIO DERMATOLÓGICO.

Topografía: Dermatitis diseminada a tronco y a extremidades superiores e inferiores. De tronco afecta sus dos caras. De extremidades superiores afecta brazos; de extremidades inferiores afecta muslos.

Morfología: Dermatitis de aspecto monomorfo, constituida por varias placas de bordes levantados y nódulos, las placas confluyen y se confunden unas con otras, dejando piel aparentemente sana en su centro. Los nódulos son de diversos tamaños que van de 0.5 cm. a 1.5 cm.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Presenta cejas, pestañas y vello corporal normales.
Mucosa nasal hiperémica.

MANIFESTACIONES NEUROLÓGICAS.

Troncos nerviosos: Presenta engrosamiento de cubi-
tales y ciaticopoplíteos externos.

Sensibilidad: Presenta pérdida de la sensibilidad
a la temperatura y al dolor en las placas y en las regio-
nes inervadas por los nervios antes citados.

Alteraciones tróficas: Presenta aplanamiento de
las eminencias tenar e hipotenar, afilamiento de los de-
dos meñiques.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de 10 años de evolución iniciado con
la aparición de "manchas blancas" con borde "rojo", las
cuales eran "entumidas". Ha tenido tratamiento a base
de 100 mg. diarios de D.D.S., de manera irregular.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscopia del lóbulo de la oreja: negativa.

Histopatología: La epidermis presenta atrofia evidente con tapones córneos. En toda dermis hay un infiltrado de histiocitos con citoplasma baculado que deja una banda libre de tejido conectivo en dermis superficial, fibrosis discreta. La tinción para bacilos A.A.R. muestra innumerables bacilos, formando numerosas globias, bacilos largos, íntegros y fragmentados.

Mitsuda: negativo

Método FDA/EB: Bacilos rojos 12 %.

Bacilos amarillos 8 %.

Bacilos verdes 80 %.

Diagnóstico: Lepra Lepromatosa Nodular.



Paciente Q.C.J.- Con el diagnóstico de Lepra Lepromatosa Nodular. Notese las placas cartográficas con bordes levantados, observese también los nódulos en la región lobar y la prueba de Mitsuda en la parte más alta del tórax.

Historia: No. 4.

Nombre: M.M.A.

Sexo: Masculino.

Edad: 38 años.

Estado Civil: Soltero.

Ocupación: Almacenista.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: El Rosario, Nayarit.

Lugar de residencia: El Rosario, Nayarit.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis diseminada a cabeza, tronco y extremidades, de los que afecta: cara en regiones ciliares y malares, pabellones auriculares, dorso de nariz, antebrazo izquierdo en su tercio medio, región lumbar, escapular y nalgas.

Morfología: Dermatitis de aspecto monomorfo, constituida por infiltración difusa y algunos nódulos, numerosas cicatrices atróficas y zonas de anhidrosis.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Presenta alopecia parcial de cejas y pestañas, en algunos lugares hace falta el vello corporal. Mucosa nasal: eritematosa y congestionada, presenta ulceración del tabique nasal.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Troncos nerviosos: Los cubitales se encuentran engrosados y dolorosos a la palpación.

Sensibilidad: Disestesia a nivel de tercio medio y distal de antebrazo izquierdo.

Alteraciones tróficas: ninguna.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de seis años de evolución iniciado con "entumecimiento" del codo izquierdo. No ha recibido tratamiento.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscopia del lóbulo de la oreja: negativa.

Histopatología: Epidermis con tapones córneos, con predominio folicular. En toda la dermis hay una reacción inflamatoria discreta a moderada formada por células linfocitarias perivasculares, en dermis superficial se observa degeneración basófila e incontinencia del pigmento. En tinción de B.A.A.R. no mostró bacilos.

Mitanda: negativo.

Método FDA/EB: negativo.

Diagnóstico: Lepra Lepromatosa Nodular.



Paciente N.M.A.- Con el diagnóstico de Le
pra lepromatosa nodular. Notese la infil-
tración y la alopecia de cejas y pestañas.

Historia: No. 5.

Nombre: O.P.J.

Edad: 31 años.

Sexo: Masculino.

Estado Civil: Casado.

Ocupación: Licenciado en Derecho.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: Sahmayo, Michoacán.

Lugar de residencia: México, D.F.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis diseminada a cara anterior de tórax, región pectoral izquierda, dorso de mano derecha, dedo medio de mano derecha, tercio inferior de mulo derecho.

Morfología: Dermatitis constituida por una placa eritematosa, cartográfica de 15x10 cm., de bordes netos y dos nódulos de 1 y 3 cm. respectivamente.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Cejas y pestañas: normales. Se observa rarefacción del vello en los nódulos. Mucosa nasal: hiperémica.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Troncos nerviosos: normales.

Sensibilidad: Disestesia a nivel de las lesiones.

Alteraciones tróficas: ninguna.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de 8 años de evolución iniciado con "manchas rojas" en el tórax y 4 años después la aparición de "bolitas" en dorso de mano derecha y muslo del mismo lado. Ha recibido tratamiento con rifampicina 1 200 mg. al mes, D.D.S. 100 mg. diarios, clofazimina 100 mg. cada tercer día, pero al no lograrse negativizar las baciloscopías se le inició tratamiento con sulfaisoxazol con trimetoprin una tableta diaria de 400 mg.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscopías de lesión cutánea, mucosa nasal y lóbulo de la oreja: negativas.

Histopatología: Epidermis adelgazada. En dermis superficial y media, alrededor de los vasos hay pequeños focos de linfocitos y numerosas células vacuoladas, se observan células de Virchow. Tinción para B.A.A.R. fue negativa.

Mitsuda: negativo.

Método FDA/EB: negativo.

Diagnóstico: Lepra lepromatosa nodular, modificada por el tratamiento.

Historia: No. 6.

Nombre: S.B.A.

Sexo: Masculino.

Edad: 60 años.

Estado Civil: Casado.

Ocupación: Carpintero.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: Cuernavaca, Morelos.

Lugar de residencia: Col, Condesa, México, D.F.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis generalizada con predominio en extremidades inferiores.

Morfología: Dermatitis de aspecto monomorfo, constituida por infiltración difusa, que le confiere a la piel un aspecto turgente. En caras anteriores de piernas existen úlceras ovales de 5 a 15 cm. de diámetro.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Troncos nerviosos: Engrosamiento muy discreto de cubitales.

Sensibilidad: Anestesia y disestesia en antebrazos y piernas.

Alteraciones tróficas: Afilamiento de dedos meñiques y aplanamiento de las eminencias tenar e hipotenar.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de siete años de evolución, iniciado con constipación nasal y desde hace seis años alteraciones de la sensibilidad en ambos antebrazos. Ha llevado tratamiento a base de D.D.S. 100 mg. diarios, clofasimina 100 mg. cada tercer día por un año. Luego se le cambió la clofasimina por rifaapicina 1 200 mg. al mes.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscopia de mucosa nasal: positiva tres cruces, algunos se encontraban fragmentados.

Baciloscopia del lóbulo de la oreja: positiva una cruz, algunos bacilos se encontraban fragmentados.

Mitsuda: negativo.

Histopatología: La epidermis muestra una estructura normal. En la dermis se observan infiltrados discretos de histiocitos vacuolados, linfocitos y algunos polinucleares neutrófilos que se disponen alrededor de los vasos. La tinción de Fite-Faraco muestra numerosos bacilos ácido-alcohol resistentes, agrupados formando globias.

Método FDA/EB: Bacilos rojos 79 %

Bacilos amarillos 0 %.

Bacilos verdes 21 %.

Diagnóstico: Lepra Lepromatosa Difusa.



**Paciente S.B.A.- Con el diagnóstico de
Lepra Lepromatosa Difusa. Obsérvese la
alopecia parcial de cejas y la alopecia
completa de pestañas.**

Historia: No. 7.

Nombre: G.J.P.

Sexo: Masculino.

Edad: 65 años.

Estado Civil: Casado.

Ocupación: Agricultor.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: Tecuala, Mayarit.

Lugar de residencia: Tecuala, Mayarit.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis generalizada.

Morfología: Dermatitis de aspecto monocrifo, constituida por infiltración difusa, zonas de atrofia, alopecias y anhidróticas.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Alopecia completa de cejas y pestañas de seis meses de evolución. Mucosa nasal: hiperémica y congestionada.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Troncos nerviosos: Engrosamiento de cubitales y de ciaticopoplíteos externos.

Sensibilidad: Anestesia e hipoestesia de las áreas antes citadas. Anestesia de las zonas inervadas por los cubitales y ciaticopoplíteos externos.

Alteraciones tróficas: Ligero aplanamiento de las eminencias tenar e hipotenar, exulceraciones y traumatismos en ambas manos.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de tres años de evolución iniciado con "entumecimiento" de brazos y piernas. Ha recibido como tratamiento, rifampicina, no recordando la dosis y de manera irregular.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscofia del lóbulo de la oreja: negativa.

Histopatología: Epidermis con hiperqueratosis folicular y aplanamiento discreto. En toda la dermis hay un discreto a moderado infiltrado formado por histiocitos de citoplasma vacuulado, linfocitos que rodean vasos y anexos hipotróficos. El B.A.A.R. muestra numerosos bacilos aislados y formando globias intracelulares y en la pared de los vasos.

Mitsuda: negativo.

Método FDA/EB: Bacilos rojos 90 %.

Bacilos amarillos 5 %.

Bacilos verdes 5 %.

Diagnóstico: Lepra Lepromatosa Difusa,



Paciente C.J.P.- Con el diagnóstico de Le
pra lepromatosa difusa. Obsérvese la in-
filtración y alopecia de cejas y pestañas.

Historia: No. 8.

Nombre: C.F.F.

Sexo: Femenino.

Edad: 64 años.

Estado Civil: Casada.

Ocupación: Labores Domésticas.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: Mexcatitlán, municipio de Santiago,
Mayarit.

Lugar de residencia: Campo de Los Limones, municipio
de Santiago, Mayarit.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis diseminada a tronco y a extre-
midad superior izquierda. De tronco afecta región sube-
capular izquierda. De extremidad superior izquierda afec-
ta brazo y antebrazo a nivel del codo.

Morfología: Dermatitis de aspecto monocrife, consti-
tuida por dos manchas, hipocrómicas, anestésicas y anhidró-
ticas de 12x20 cm. y 12x9 cm. de diámetro respectivamente.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Presenta alopecia parcial de cejas, pestañas y vello normales. Mucosa nasal hiperémica y congestionada.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Troncos nerviosos: Presenta engrosamiento de nervios cubitales y ciaticopoplíteos externos.

Sensibilidad: Presenta pérdida de la sensibilidad a la temperatura y al dolor en las manchas antes citadas.

Alteraciones tróficas: ninguna.

INTERROGATORIO,

Padecimiento de veinte años de evolución, iniciado con una zona "entumida" en codo izquierdo. No recuerda los tratamientos anteriores.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Endoscopia del lóbulo de la oreja: negativa.

Histopatología: Epidermis con zonas de atrofia.
En dermis superficial hay un infiltrado linfohistiocitario perivascular. El resto de dermis muestra anexos atróficos. La tinción de B.A.A.R. no mostró bacilos.

Mitsuda: negativo.

Método FDA/EB: Bacilos rojos 4.28 %
Bacilos amarillos 2.85 %
Bacilos verdes 92.85 %.

Diagnóstico: Lepra caso indeterminado, Mitsuda negativo.



Paciente C.F.F.- Con el diagnóstico de Lepra caso indeterminado, Mitsuda negativo. Se observa una mancha hipocrómica que es anestésica.

Historia: No. 9.

Nombre: G.O.A.

Sexo: Femenino.

Edad: 50 años.

Estado Civil: Casada.

Grupo étnico: Mestizo.

Ocupación: Labores domésticas.

Lugar de nacimiento: San Ignacio, municipio de Mazatlán,
Sinaloa.

Lugar de residencia: Tepic, Nayarit.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis diseminada a tronco, del que afecta región subescapular izquierda.

Morfología: Dermatitis de aspecto monomorfo, constituida por una mancha oval de 5x3 cm. de diámetro, de límites poco netos, la que es anestésica.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Cejas, pestañas y mucosa nasal: normales. Vello corporal: ausencia en la mancha antes citada.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Nervios periféricos: normales.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de siete años de evolución iniciado con alteraciones de la sensibilidad en la región subescapular izquierda, acudió con un médico particular el que le indico vitaminoterapia.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscofia del lóbulo de la oreja: negativa.

Histopatología: La epidermis presenta zonas de atrofia. En toda la dermis hay mínimo infiltrado linfocitario perivascular. Hay atrofia de anexos. El B.A.A.R. es negativo.

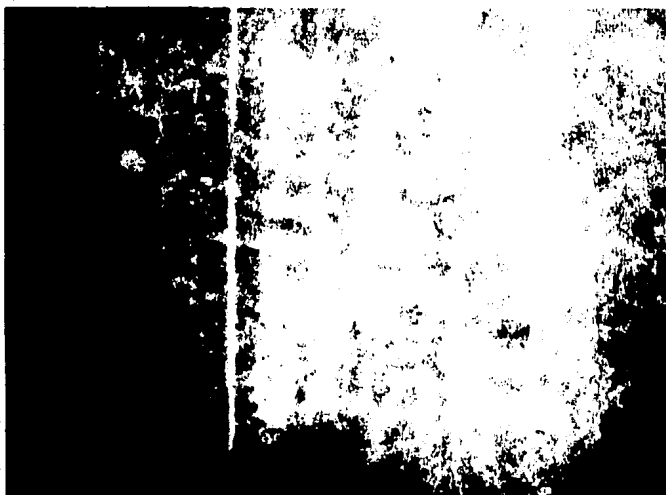
Mitsuda: negativo.

Método FDA/EB: Bacilos rojos 21 %.

Bacilo amarillos 15 %.

Método FDA/EB: Bacilos verdes 64 %.

Diagnóstico: Lepra caso indeterminado, Mitsuda negativo.



Faciente G.C.A.- Con diagnóstico de Lepra caso indeterminado, Mitsuda negativo. Obsérvese una mancha hipocrónica, anestésica, poco ostensible, con la prueba de la histamina.

Historia: No. 10.

Nombre: G.V.L.

Sexo: Masculino.

Edad: 62 años.

Estado Civil: Casado.

Ocupación: Jornalero.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: Notaje, municipio de Acaponeta
Mayarit.

Lugar de residencia: Notaje, municipio de Acaponeta
Mayarit.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis localizada a extremidad su-
perior derecha, de la que afecta tercio inferior de bra-
so y todo el antebrazo.

Morfología: Dermatitis de aspecto monomorfo, cons-
tituida por una mancha hipercrómica de color negro en
forma de "Q", de límites poco netos, de 8x5 cm., la man-
cha es anestésica y anhidrótica, rodeada de piel seca de
aspecto ictiosiforme. En su centro se observa una zona
atrófica.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Cejas, pestañas y vello corporal: normales. Mico_
sa nasal: hiperéfica.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Troncos nerviosos: presenta engrosamiento del cubi_
tal derecho.

Sensibilidad: Presenta anestesia del codo derecho.

Alteraciones tróficas: ninguna.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de tres años de evolución iniciado con
"calambres" y "entumecimiento" de cara posterior de codo
derecho. No ha recibido ningún tratamiento.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscopia del lóbulo de la oreja: negativa.

Histopatología: La epidermis muestra áreas de atrofia. En toda la dermis hay un infiltrado linfohistiocitario perivascular. Hay atrofia de anexos. La tinción de B.A.A.R. es negativa.

Mitsuda: negativo.

Método FDA/EB: Bacilos rojos 76 %.

Bacilos amarillos 1 %.

Bacilos verdes 23 %.

Diagnóstico: Lepra caso indeterminado, Mitsuda negativo.



Paciente G.V.L.- Con el diagnóstico de Lepra caso indeterminado, Mitsuda negativo. Notese la mancha hipertrófica de color negro, rodeada de piel seca de aspecto ictiosiforme.

Historia: No. 11.

Nombre: L.G.E.

Edad: 43 años.

Sexo: Masculino.

Estado Civil: Unión libre.

Ocupación: Jornalero.

Grupo étnico: Mestizo

Lugar de nacimiento: Ameca, Jalisco.

Lugar de residencia: Tuxpan, Nayarit.

ESTUDIO DERMATOLEPTOLOGICO.

Topografía: Dermatitis diseminada a tronco y a extre-
midad inferior derecha. De tronco afecta abdomen y de és-
te mesogastrio y flanco derecho. De extremidad inferior
derecha afecta pierna en su cara anteroexterna.

Morfología: Dermatitis de aspecto monocrifo, consti-
tuida por dos manchas, ovales, de límites natos, hipocró-
nicas y anestésicas, de 6x3 y 15x10 cm. respectivamente.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Cejas, pestañas, vello y mucosa nasal: No se encuen-
tran afectados.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Troncos nerviosos: normales.

Sensibilidad: Anestesia en las manchas anteriormente citadas.

Alteraciones tróficas: ninguna.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de seis años de evolución, iniciado con una "mancha blanca" en la "barriga", la que se encontraba "entumida". Ha recibido tratamiento a base de 100 mg diarios de D.D.S., que a tomado de una forma irregular.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Facioscopia del lóbulo de la oreja: negativa.

Histopatología: Epidermis con atrofia. En toda dermis hay un discreto infiltrado linfocitario que rodea vasos de pared engrosada y dos troncos nerviosos engrosados. El B.A.A.R. es negativo.

Mitsuda: negativo.

Método FDA/EB: Bacilos rojos 48 %.

Bacilos amarillos 0 %.

Bacilos verdes 52 %.

Diagnóstico: Lepra caso indeterminado, Mitsuda
negativo.



Paciente L.G.E.- Con el diagnóstico de Lepra caso indeterminado, Mitsuda negativo. Se puede ver una mancha hipocrómica, la cual es anestésica.

Historia: No. 12.

Nombre: M.S.T.

Sexo: Masculino.

Edad: 48 años.

Estado Civil: Casado.

Ocupación: Campesino.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: Rancho Coyol Grande, municipio de
Micupétaro, Michoacán.

Lugar de residencia: Rancho Las Juntas, municipio de
Micupétaro, Michoacán.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis disseminada a ambas extremida
des inferiores, de las que afecta dorso de ambos pies y
caras anteriores de tobillos.

Morfología: Dermatitis de aspecto monoacrifo, consti
tuida por dos placas hipocrónicas, anestésicas, alopécicas
y anhidróticas, de forma oval y de aproximadamente 8 cm.
de diámetro.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Cejas, pestañas, vello corporal y mucosa nasal: normales.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Trocos nervicosos: Nervios cubitales discretamente engrosados y dolorosos.

Sensibilidad: Anestesia en dorso de pies.

Alteraciones tróficas: ninguna.

INTERROGATORIO.

Padecimiento iniciado a los 16 años de edad, cuando empezó a notar, que no sentía en los pies después de una cortada, posteriormente vió que se le "cayó el palé" en las zonas que no sentía, hasta que por una revisión de contactos lo enviaron al centro dermatológico Fascua.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscopia de lesión cutánea, lóbulo de la oreja y mucosa nasal: negativas.

Histopatología: Epidermis ligeramente aplanada. En dermis media y superficial se observa un discreto infiltrado linfohistiocitario alrededor de anexos. Tinción para B.A.A.R. negativo.

Mitsuda: positivo.

Método FDA/EB: negativo.

Diagnóstico: Lepra caso indeterminado, Mitsuda positivo.



Paciente M.S.T.- Con el diagnóstico de Le
pra caso indeterminado, Mitsuda positivo.
Se puede ver el signo de "la mujer" y la
placa escamosa, alopécica y anhidrótica.

Historia: No. 13.

Nombre: T.T.C.

Sexo: Femenino.

Edad: 28 años.

Estado Civil: Casada.

Ocupación: Labores Domésticas.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: La Cuadrilla, municipio de Huauchinango, Jalisco.

Lugar de residencia: Amatlán de Cafias, Mayarit.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis localizada a tronco del que afecta, hombro izquierdo.

Morfología: Dermatitis de aspecto monomorfo, constituida por una mancha oval de 5x3 cm. de diámetro, hipocrónica, anestésica.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Cejas, pestañas, vello y mucosa nasal: no se encuentran afectados.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Troncos nerviosos: sin alteraciones. Solo se encuentra la anestesia en las manchas antes citadas.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de un año de evolución, iniciado con una mancha hipocrómica, con alteraciones de la sensibilidad. No ha recibido ningún tratamiento.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

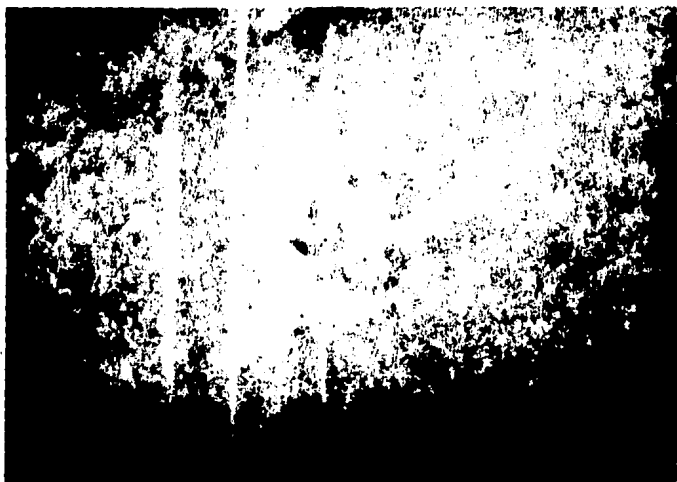
Baciloscopia del lóbulo de la oreja: negativa.

Histopatología: La epidermis muestra hiperqueratosis ortoqueratósica y aplanamiento de los procesos interpapilares. En dermis superficial, media y profunda se observan infiltrados moderados que se disponen alrededor de los vasos y anexos. Estos infiltrados se encuentran constituidos por linfocitos, histiocitos, células epiteloides y células gigantes tipo Langhans. En dermis profunda se observan algunos filotes nerviosos engrosados.

Muestra: 5 mm.

Método FDA/EB: negativo.

Diagnóstico: Lepra Tuberculoides.



Paciente T.T.C.- Con el diagnóstico de Lepra tuberculoides. Notese una mancha hipocrómica, la que es anestésica, con la prueba de la histamina (Triple respuesta de Lewis incompleta).

Historia: No. 14.

Nombre: R.R.E.

Sexo: Femenino.

Edad: 65 años.

Estado Civil: Unión libre.

Ocupación: Labores Domésticas.

Grupo étnico: Mestizo.

Lugar de nacimiento: Quasochilar, municipio de Huajuco_ri, Myarit.

Lugar de residencia: Novilleros, Myarit.

ESTUDIO DERMATOLEPROLOGICO.

Topografía: Dermatitis diseminada a extremidades superiores e inferiores, de las que afecta: tercios inferiores de ambos brazos, tercios superiores de antebrazos y caras anteroexternas de ambas rodillas.

Morfología: Dermatitis de aspecto monomorfo, constituida por cuatro manchas de límites poco netos, con hipocromía y anestesia. Las dos mayores miden 10x5 cm. y las dos menores 5x3 cm. aproximadamente.

RESTO DE PIEL Y ANEXOS.

Presenta alopecia parcial de cejas; pestañas y vello corporal normales. Mucosa nasal: hiperémica.

MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS.

Troncos nerviosos: cubitales y cisticopoplíteos externos se encuentran engrosados.

Sensibilidad: Presenta anestesia de la rodilla derecha y disestesia en las otras manchas.

INTERROGATORIO.

Padecimiento de un año de evolución, iniciado con alteraciones de la sensibilidad a nivel de la rodilla derecha. No ha recibido tratamiento.

ANALISIS COMPLEMENTARIOS.

Baciloscopia del lóbulo de la oreja: negativa.

Mitazuda: positivo.

Histopatología: La epidermis muestra hiperqueratosis ortoqueratósica moderada. En dermis superficial, media y profunda, se observan infiltrados moderados al rededor de vasos y anexos. Estos infiltrados están constituidos por linfocitos, histiocitos y algunas células epiteliales. Tinción para B.A.A.R. negativa.

Método FDA/MB: negativo.

Diagnóstico: Lepra Tuberculoides.



Paciente R.R.E.- Con el diagnóstico de La
pra Tuberculoides. Obsérvese la alopecia
parcial de cejas.

VII RESULTADOS

RESULTADOS.

De los 14 pacientes estudiados y de acuerdo a los cuatro parámetros diagnósticos: clínico, bacteriológico, histopatológico e inmunológico, se integraron los siguientes diagnósticos: 7 pacientes con *Leprosy Lepromatosa*, de los cuales 5 fueron nodulares y 2 difusos; 5 pacientes con *Leprosy* caso indeterminado, de los que 4 fueron Mitsuda negativos y 1 con Mitsuda positivo. A 2 se les diagnosticó *Leprosy Tuberculoides*.

De los 7 pacientes con *Leprosy Lepromatosa*, 6 recibían tratamiento y 1 no; 2 tomaban 100 mg. diarios de D.D.S. de una manera irregular, 2 tomaban D.D.S. 100 mg. combinado con rifampicina 1 200 mg. al mes, 1 solo tomaba rifampicina sin dosis habitual y de manera irregular. Uno tomaba sulfaisoxazol con trimetoprim 400 mg. diarios, al que ya se le habían ensayado diversos tratamientos como son: D.D.S. con clofazimina y D.D.S. con rifampicina, no lográndose negativizar las baciloscopias, solo hasta después de la administración del sulfaisoxazol con trimetoprim. El estudio histopatológico y el método FDA/MS en la búsqueda de bacilos fue concordante.

De los 7 pacientes lepromatosos en todos fueron concordantes los estudios de tinción para B.A.A.R. y el método FDA/EB. De los 6 pacientes lepromatosos con tratamiento solo en uno el FDA/EB fue negativo y 5 tuvieron bacilos verdes o sea bacilos vivos, 2 de ellos tuvieron 50 % y 80 % respectivamente de bacilos verdes y 3 menos del 50 %. Un paciente lepromatoso sin tratamiento resulto sin bacilos en la histopatología y en el FDA/EB (Cuadro 12).

De los 4 pacientes con Lepra caso indeterminado con Mitsuda negativo, el resultado de la búsqueda de bacilos en la histopatología no fue concordante con el FDA/EB, ya que en éste si se encontraron bacilos; 3 pacientes con bacilos verdes por arriba del 50 % del contenido total y uno con menos del 50 %. Todos presentaron bacilos rojos o sea muertos. En el único paciente con Lepra caso indeterminado Mitsuda positivo, tanto en la histopatología como en el FDA/EB no se encontraron bacilos (Cuadro 13).

En los 2 pacientes con Lepra Tuberculoide sin tratamiento, no se encontraron bacilos en la histopatología y con el FDA/EB (Cuadro 13).

RESULTADOS EN PACIENTES LEPROMATOSOS

PACIENTES	DIAGNOSTICO	TRATAMIENTO	TINCION DE B.A.A.R. EN TEJIDOS	METODO FDA/EB		
				BACIOS ROJOS	AMARILLOS	VERDES
1) U.Z.N.	L.L.N.	D.D.S. 100 mg/día Ingestión Irregular	+	57%	6 %	37 %
2) H.C.J.G.	L.L.N.	D.D.S. 100 mg/día RIFAMPICINA 1200 mg/mes	+	46%	4 %	50 %
3) Q.C.J.	L.L.N.	D.D.S. 100 mg/día Ingestión Irregular	+	12%	8 %	80 %
4) M.M.A.	L.L.N.	SIN TRATAMIENTO	-	0%	0 %	0 %
5) O.P.J.	L.L.N.	SULFAISOXASOL CON TRIMETOPRIM 400mg/día	-	0%	0 %	0 %
6) S.B.A.	L.L.D.	D.D.S. 100 mg/día RIFAMPICINA 1200 mg/mes	+	79%	0 %	21%
7) C.J.P.	L.L.D.	RIFAMPICINA Ingestión Irregular	+	90%	5 %	5%

CUADRO No. 12

L.L.N. LEPROMATOSA NODULAR.

L.L.D. LEPROMATOSA DIFUSA.

+ POSITIVO.

- NEGATIVO.

RESULTADOS DE PACIENTES CON LEPROSA CASOS INDETERMINADOS Y TUBERCULOIDES

PACIENTES	DIAGNOSTICO	MITSUDA	TRATAMIENTO	TINCION PARA B.A.A.R. EN TEJIDOS	FDA / EB		
					BACILOS ROJOS	AMARILLOS	VERDES
8) C.F.F.	L.C. I.	—	S / T	—	4.28 %	2.85 %	92.85 %
9) G.O.A.	L.C. I.	—	S / T	—	21 %	15 %	64 %
10) G.V.L.	L.C. I.	—	S / T	—	76 %	1 %	23 %
11) L.G.E.	L.C. I.	—	D.D.S. 100mg/día Ingestión Irregular	—	48 %	0 %	52 %
12) M.S.T.	L.C. I.	+	S / T	—	0 %	0 %	0 %
13) T.T.C.	L.T.	+	S / T	—	0 %	0 %	0 %
14) P.R.E.	L.T.	+	S / T	—	0 %	0 %	0 %

CUADRO No. 13

L.C.I. LEPROSA CASO INDETERMINADO.

S/T SIN TRATAMIENTO.

+ POSITIVO.

- NEGATIVO.

VIII DISCUSSION

DISCUSION.

Creemos pertinente antes de someter a discusión algunos de los resultados obtenidos, poner a su consideración el dato de la lectura en nuestro microscopio, nuestro microscopio es un microscopio de luz ultravioleta transmitida y no de epifluorescencia, ya que pensamos que ésto condicionó que el máximo aumento útil para la lectura de nuestra prueba, fuera el obtenido con el objetivo 40 X, ya que con el objetivo de inmersión la definición era mala y difícil la interpretación de nuestra prueba.

Es importante recalcar que de la valoración por medio del FTA/BB de los 6 pacientes leprosumos tratados con diversos esquemas solo uno fue el que está aparentemente controlado, sin haberse podido detectar bacilos por medio de la histopatología y el FTA/BB. Ahora con respecto al paciente leprosumo sin tratamiento en el cual no se detectaron bacilos, tanto con la tinción de B.A.A.R. como con el FTA/BB, ni tampoco fue posible observar por medio de la histopatología, la conformación leprosumo características, creemos que ésto se debió a que el lugar escogido para la biopsia

no fue el adecuado, pensamos que éste podría ser un factor importante para la adecuada interpretación de futuras falsas negativas.

Con respecto a los casos indeterminados de lepra con Mitsuda negativo y la falta de concordancia entre la tinción para B.A.A.R. y el FDA/EB, puesto que en el B.A.A.R. no se encontraron bacilos y en el FDA/EB sí, creemos que el FDA/EB es un método más sensible para la detección de bacilos, ya que al resuspender la suspensión de bacilos con eter de petróleo y agitar es como depurar de bacilos los tejidos sometidos al procedimiento y así es mucho más fácil detectar a éstos. Talves éste tenga importancia pronostica aunada al Mitsuda negativo en aquellos pacientes que posteriormente van a ser lepromatosos.

También podemos considerar que sigue siendo difícil encontrar bacilos en los casos Tuberculoides tanto en la histopatología como con el método de FDA/EB ya que en nuestros dos casos en ninguno encontramos bacilos.

En estos procedimientos nuevos es importante el costo de la prueba, el costo de ésta con respecto a los reactivos utilizados quizás no rebase los treinta pesos, pero el costo importante está en el costo del microscopio de las ultravioleta que actualmente es de dos millones de pesos mexicanos, por lo que esta prueba solo puede ser rentable a nivel institucional en México.

IX CONCLUSIONS

CONCLUSIONES.

- 1.- Se cumplieron todos los objetivos.
- 2.- No hubo concordancia del FDA/EB con la tinción de B.A.A.R. en los pacientes con casos indeterminados de lepra Mitsuda negativos.
- 3.- El FDA/EB detecta más fidedignamente los bacilos que la tinción de B.A.A.R. en tejidos.
- 4.- Si hubo concordancia entre el FDA/EB y la tinción para B.A.A.R. en los pacientes con lepra tuberculoides y caso indeterminado Mitsuda positivo.
- 5.- Habo concordancia del FDA/EB y la tinción para B.A.A.R. en los pacientes con lepra lepromatosa no dular y difusa.
- 6.- El procedimiento es de rápida ejecución.
- 7.- Es de utilidad clínica y puede servir para la investigación básica.

- 8.- El FDA/EB puede servir para valorar esquemas de tratamiento.
- 9.- El FDA/EB puede servir para evaluar medios de cultivo.
- 10.- Es un método cuantitativo para medir la viabilidad del *Mycobacterium leprae*
- 11.- Puede servir para detectar resistencia al tratamiento.
- 12.- Es económico en cuanto a material gastable, pero no en equipo.

I. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALBUQUERQUE A.: Cultivo del *Mycobacterium leprae*.
Bol.Acad.Med.Med. 10:334-338, 1939.
- 2.- ARENAS M. del P.: *Mycobacterium leprae* en conjuntiva,
búsqueda de B.A.A.R. en treinta biopsias de enfer-
mos de lepra. Tesis de postgrado en Dermatolepro-
logía. Centro Dermatológico Pascua. México, D.F.,
1978.
- 3.- AZULAY, R. y ANIBADE, L.: Pesquisa do lípido intracito-
plasmático nas varias estruturas histológicas en-
contradas na lepra. Ann.Brasil.Dermatol., 44 (3):
181-189, 1952.
- 4.- BALINA, L.; VALDEZ, R.; REBO, A.; MARTINEZ, A.; DIAZ, P.;
BIANCHI, O.; GARCIA, N. y BELLOO, J.: Estudios con
Dasypus Hybridus (mulita), *Dasypus novemcinctus*
(Tatí) y *Chaetofrastus villosus* (Peludo). Rev.
Arg.Dermatol. 61 (185):151-154, 1980.
- 5.- BRICENO, T.: El armadillo (cachicamo) en la investi-
gación médica. Gas.Med.Caracas., 83 (10-12):873-880,
1975.

- 6.- BRYCESON, A. y PFALTZGRAFF, R.: Leprosy for students of medicine. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1973.
- 7.- CANARGO, E.; KERTSCHER, J.; LARSON, S.; TEPPER, B y WAGNER, N.: Radiometric measurement of differential metabolism of fatty acid by mycobacteria. Int. J. Lepr. 50 (2):200-204, 1982.
- 8.- COLLINS, F.; MORRISON, E.; HOPPE, A. y WATSON, S.: Microscopic counts carried out on Mycobacterium leprae and Mycobacterium tuberculosis suspensions. A comparison of three staining procedures. Int.J.Lepr. 48 (4):402-403, 1980.
- 9.- CHATTERJEE, K. y DAS-GUPTA, M.: Observations on the morphology of M. leprae by ordinary optical phase microscopy and electron microscopy. Int.J.Lepr. 23 (4):387-391, 1955.
- 10.- CHAUSSINAND, R. y BESSE, P.: Inoculation du bacille de Hansen et du bacille de Stefanaky a la perche Arc-en-ciel. Int.J.Lepr. 19 (1):4-7, 1951.

- 11.- DE OVANDO, F.: Evaluación clínica y bacteriológica de la asociación Clofazimina-Rifampicina en el tratamiento de pacientes con lepra lepromatosa sulfonresistente. Tesis de postgrado en Dermatoleprología. Centro Dermatológico Pascua. México, D.F. 1981.
- 12.- DELVILLE, J.: La ácido resistencia del Mycobacterium leprae y los problemas que plantea su cultivo. XI Congreso Internacional de la Lepra. México, D.F. 1978.
- 13.- DONKERSLOT, J.; ROBRISH, S. y KRICHEVSKY, M.: Fluorographic determination of desoxyribonucleic acid in bacteria with etidium bromide. APPL. Microbiol. 24: 179-183, 1970.
- 14.- BRAPER, PH.: On cultivating Hansen's bacillus. The Star. 39 (3):12-16, 1979.
- 15.- MCHANIZ, B.: Estudio comparativo entre los métodos de tinción para el Mycobacterium leprae, Fite-Faraco modificado y Hazada. Tesis de postgrado en Dermatoleprología. Centro Dermatológico Pascua. México, D.F. 1979.

- 16.- **EDDIN, M.:** A rapid quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J.Immunol.* 104:1303-1306, 1972.
- 17.- **FERNANDEZ, G.; REGALADO, D.; GRILLO, R.; MANZUR, J.; PUERTAS, S.; NOJAS, A.; DELGADO, J. y MARTINEZ, H.:** *Mycobacterium leprae*. *Rev.Cub.Med.* 7 (1):93-109, 1968.
- 18.- **FREIRE, S.:** Methods of cultivation of the Hansen bacillus. *Int.J.Lepyr.* 24 (1):57-63, 1956.
- 19.- **FREIRE, S.:** Cultivation of the leprosy bacillus. *Int. J.Lepyr.* 23 (4):483-486, 1955.
- 20.- **GARRIDO, N. y AZULAY, R.:** La importancia de la coloración de lípidos en la clasificación de la lepra. XI Congreso Internacional de la Lepra, México, D.F. 1978.
- 21.- **HAEKLER, W. y ZITI, L.:** Reactions produced by experimental inoculation of *Mycobacterium lepraesurium* into the Golden hamster. *Int.J.Lepyr.* 24 (1): 297-305, 1956.

- 22.- HANKE, J.: Demonstration of capsules in *Mycobacterium leprae* during carbol-fuchsin staining mechanism of the Ziehl-Neelsen stain. *Int.J.Lepr.* 29 (2):179-182, 1961.
- 23.- HARADA, K.: A modified allochrome procedure for demonstrating mycobacteria in tissue sections. *Int.J. Lepr.* 45 (10):49-51, 1976.
- 24.- HARRISON, J. y HESLOP, M.: Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence, intracellular hydrolysis fluorescein diacetate. *Stain. Technol.* 55:253-258, 1980.
- 25.- HASTINGS, R.: La actividad del ácido ascórbico en la inhibición de la multiplicación del *Mycobacterium leprae* en las patas del ratón. *Int.J.Lepr.* 44 (4):427-430, 1976.
- 26.- HIRATA, T.: Electron microscopic observation of intracytoplasmic membranous structure in *M. leprae* by means of serial ultrathin sectioning. *Int.J.Lepr.* 46 (3-4):372-376, 1978.

- 27.- JARDIN, J. y LUSHSINGER, D.: The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of Mycobacteria. Stain.Technol. 55:253-258, 1980.
- 28.- JOB, C., KIRSCHHEIMER, W. y SANCHEZ, R.: Liver lesions in experimental lepromatoid leprosy of the armadillo a histopathologic study. Int.J.Lep. 46 (1):118-119, 1978.
- 29.- KANEHUNA, F.: A study of malachite green staining of leprosy bacilli. Int.J.Lep. 32 (2):185-194, 1964.
- 30.- KIRSCHHEIMER, W.: Survey of recent leprosy research. Publ.Health.Reports. 79 (6):481487, 1964.
- 31.- KIRSCHHEIMER, W. y PRABHAKARAN, K.: Metabolic and biologic test on Mycobacteria once labelled as leprosy bacilli. Int.J.Lep. 36 (2):162-165, 1968.
- 32.- KIRSCHHEIMER, W. y STORRS, E.: H.D. transmitted to an armadillo. The Star. 30 (6):1-2, 1971.

- 33.- KIRCHHEIMER, W. y STORRS, E.: Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. *Int.J.Lep.* 39 (3):693-701, 1971.
- 34.- KIRCHHEIMER, W. y STORRS, E.: Histopathologic and bacteriologic post-mortem findings in lepromatoid leprosy in the armadillo. *Int.J.Lep.* 40 (3):229-241, 1972.
- 35.- KIRCHHEIMER, W.: The role of arthropods in the transmission of leprosy. *Lep.India.* 45:29-34, 1973.
- 36.- KIRCHHEIMER, W. y SANCHEZ, M.: Leprosy susceptibility testing of armadillos to late cell and bacterial responses at inoculation site of living leprosy bacilli in resistant armadillo. *Microbios.* 8:241-246, 1973.
- 37.- KIRCHHEIMER, W. y SANCHEZ, M.: Survival of *Mycobacterium leprae* in cutaneous inoculation sites of armadillos. *Lep.India.* 47 (1):5-8, 1975.

- 38.- KIRCHHEIMER, W.: Recent advances in experimental leprosy. *Soth.Med.J.* 69 (8):993-996, 1976.
- 39.- KIRCHHEIMER, W.: Occurrence of *Mycobacterium leprae* in nature. *Lepr.India.* 49 (1):44-47, 1977.
- 40.- KIRCHHEIMER, W.: Experimental transmission of leprosy world-wide. *Lepr.India.* 50 (3):371-374, 1978.
- 41.- HOLMER, J.: Diagnóstico clínico por exámenes de laboratorio. Primera edición. 955-957. New York, U.S.A., 1945.
- 42.- KVACH, J. y VERAS, J.: A fluorescent staining procedure for determining viability of *Mycobacterial* cells. *Int.J.Lep.* 50 (2):183-192, 1982.
- 43.- LATAPI, F.: Apuntes tomados en la cátedra de dermatología y leprología. Centro Dermatológico Pascua. México, D.F., 1982.
- 44.- LANGHILLON et CARAYON: Précis de Leprologie. Masson y Cia. París, Francia. 1969.

- 45.- MO. RAE, S.: Carville researcher questions armadillo leprosy findings. Foll. 4689. Biblioteca del Centro Dermatológico Pascua. México, D.F., 1984.
- 46.- MEDZO, E. y BRAY, M.: Direct measurement of acetyl esterase in living protist cells. J.Bacteriol. 402-445, 1969.
- 47.- NARAYANAN, K.; SHANKARA, M.; BEDI, B.; KIRCHHEIMER, W. y BALASUBRAHMANYAN.: Experimental transmission of leprosy to animals: A preliminary note on attempt to transmit leprosy to the Indian pangolin. (*Manis crassicaudata geoffroy*). Lepr.India. 46 (3): 1-5, 1940.
- 48.- NARAYANAN, E.; SHANKARA, K.; KIRCHHEIMER, W. y BALASUBRAHMANYAN.: Occurrence of *Mycobacterium leprae* in arthropods. Lepr.Rev. 43:194-198, 1972.
- 49.- NARAYANAN, E.; KIRCHHEIMER, W. y BALASUBRAHMANYAN.: Experimental transmission of leprosy to animals: A preliminary note on attempt to transmit leprosy to *Slender loris, tardigradus*. Lepr.India. 48 (1):36-41, 1976.

- 50.- MARAYANAN, R.; KIRCHHEIMER, W. y BEDI, B.: Transfer of leprosy bacilli from patients to mouse foot pads by *Aedes aegypti*. *Lepr.India.* 49 (2):181-186, 1977.
- 51.- MARAYANAN, R.: Recent advances in microbiology in leprosy. *Lepr.India.* 49 (1):10-35, 1977.
- 52.- PALOMARES, M. del P.: Tinción de lípidos del *Mycobacterium leprae* por sudan III. Tesis de postgrado en Dermatoleprología. Centro Dermatológico Pascua. México, D.F., 1979.
- 53.- PATONA, M. y JONAS, S.: The observation and enumeration of microorganism in fluids, using membrane filtration and incident fluorescent microscopy. *J. Appl. Bacteriol.* 38:199-200, 1975.
- 54.- PERSIDSKY, M. y BAILLE, G.: Fluoroaerobic test cell membrane integrity. *Criobiol.* 14:322-331, 1977.
- 55.- PRABHAKARAN, K.: Actividad de Dopa-oxidasa, prueba para la identificación del *M. leprae*. *Int. J. Lepr.* 34 (1):125-128, 1966.

- 56.- PRABHAKARAN, K., KIRCHHEIMER, W. y HARRIS, E.: Oxidation of phenolic compounds by *Mycobacterium leprae* and inhibition of phenolase by substrate analogues and copper chelators. *J.Bacteriol.* 95 (6): 2051-2053, 1968.
- 57.- PRABHAKARAN, K., KIRCHHEIMER, W. y HARRIS, E.: Effects of inhibitors of phenoloxidase of *Mycobacterium leprae*. *J.Bacteriol.* 100 (2):935-938, 1969.
- 58.- PRABHAKARAN, K., HARRIS, E. y KIRCHHEIMER, W.: The interaction of *Mycobacterium leprae* and melanocytes in vitro. *Cytobios.* 4 (1):93-95, 1971.
- 59.- PRABHAKARAN, K., HARRIS, E. y KIRCHHEIMER, W.: The nature of phenolase enzyme in *Mycobacterium leprae*: Structure activity relationships of substrates and comparison with other copper proteins and enzymes. *Microbios.* 5 (1):273-281, 1972.
- 60.- PRABHAKARAN, K.: Carville researcher explores role of DOPA. *The Star.* 33 (1):4, 1973.

- 61.- PRABHAKARN, K.; KIRCHHEIMER, W. y HARRIS, E.: Particulate nature of O-Diphenoloxidase in *Mycobacterium leprae* and assay of the enzyme by the radioisotope technique. *Microbios.* 8 (1):52-53, 1973.
- 62.- PRABHAKARAN, K.: Rapid identification test of *M. leprae*. *Lepr.Rev.* 45 (1):52-53, 1974.
- 63.- PRABHAKARAN, K.; HARRIS, E. y KIRCHHEIMER, W.: Survival of *Mycobacterium leprae* in tissues frozen at -80°C . *Mic.Letters.* 1:193-195, 1976.
- 64.- PRABHAKARAN, K.; KIRCHHEIMER, W. y HARRIS, E.: El bacilo de Hansen fracasos en intentos de cultivo. *La Estrella.* 1-2, julio, agosto, 1977.
- 65.- REES, J.; Mc. DOUGALL, A. y WEDDELL, A.: The nose in mice with experimental human leprosy. *Lepr.Rev.* 45:112-120, 1974.
- 66.- REYES, A.: Modificación de la técnica de Fite-Faraco para la coloración de bacilos ácido-alcohol resistentes en cortes de tejidos. *Der.Rev.Mex.* 7 (2): 138-142, 1963.

- 67.- RODRIGUEZ, O.: La lepra en los niños. Tesis de post-
grado en Dermatoleprología. Centro Dermatológico
PASOJA. México, D.F., 1949.
- 68.- ROJAS, A.: El laboratorio en lepra. Rev.Med.Costa Ri
ca. 33 (388):327-329, 1966.
- 69.- ROTMAN, B. y PAPERMASTER, B.: Membrane properties of
living mammalian cells as studies by enzymatic hi-
drolysis of fluorogenic esters. Pro.Nat.Sci.
Washington, D.C. 55:134-141, 1966.
- 70.- ROTBERG, A. y BECHELLI, L.: Tratado de leprología
Vol. I. Segunda Edición. Rio de Janeiro, Brasil.
196-217, 1950.
- 71.- Topley, W.: Principles of bacteriology and immunity
Tercera Edición. Londres, Inglaterra. 404-542,
1946.